

B. Müller

1971

Untersuchungen über das aktive Zentrum und den Katalysemechanismus des Kallikreins aus Schweinepankreas

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Bernhard Müller
München

August 1971



1. Berichterstatter: Prof. E. Werle

2. Berichterstatter: Prof. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.1971

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für
Klassische Philologie und Altertumskunde der
Universität Bonn angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Dr. F. Hülbe habe ich herzlich
für die freundliche Aufnahme dankend
erwidert.

Herrn Dr. F. Hülbe habe ich für die
Korrektur der vorliegenden Arbeit
dankend erwiedert.

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für
Klinische Chemie und Klinische Biochemie der
Universität München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle danke ich herzlich
für die großzügige Förderung meiner Arbeit.

Herrn Dr. F. Fiedler danke ich für zahlreiche
Diskussionen und wertvolle Anregungen.

Inhaltsübersicht

		Seite
1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Überblick über die bisherige Kenntnis der Enzymologie der Kallikreine	2
2.1	Die Enzyme der Kallikreingruppe	2
2.1.1	Historischer Überblick	2
2.1.2	Abgrenzung der Kallikreine gegenüber anderen Enzymen	3
2.1.3	Die Kallikreine des Schweins	5
2.2	Das Schweinepankreas-kallikrein	6
2.2.1	Eigenschaften	6
2.2.2	Aktivitätseinheiten	10
3	Untersuchung von Kallikreinen mittels Diisopropylfluorophosphat	12
3.1	Vergleich der Reaktionsfähigkeit verschiedener Kallikreine des Schweins	12
3.2	Vergleich von Aminosäuresequenzen des aktiven Zentrums von Schweinepankreas-kallikrein mit denen anderer Serinproteinasen	18
3.2.1	Die Aminosäuresequenz um das Serin im aktiven Zentrum von Serinproteinasen	18
3.2.2	Elektrophoretische Auftrennung von DFP-32-Kallikreinhydrolysaten	20
3.2.3	Untersuchung der Aminosäurezusammensetzung der einzelnen radioaktiven Zonen	23
4	Katalysemechanismus und aktives Zentrum des Schweinepankreas-kallikreins	26
4.1	Der Acylenzym-Mechanismus	26

	Seite
4.1.1 Serinhydrolasen	26
4.1.2 Kallikrein	29
4.2 Umsetzung von Kallikrein mit Cinnamoyl- und Indolacryloylimidazol	30
4.2.1 Kinetische Konstanten der Reaktion	30
4.2.2 Spektrale Eigenschaften von Cinnamoyl- und Indolacryloylkallikrein	44
4.2.3 Vergleich des aktiven Zentrums von Kalli- krein mit dem anderer Serinproteinasen	48
4.3 Umsetzung von Kallikrein mit p-Nitrophenyl- p'-guanidinobenzoat	52
4.3.1 Biphasischer Verlauf der p-Nitrophenol- Freisetzung	52
4.3.2 Titrationstheorie	56
4.3.3 Titration des aktiven Zentrums von Kalli- krein	60
5 Material und Methoden	70
5.1 Material	70
5.2 Methoden	71
5.2.1 Bestimmung der Kallikreinaktivität ("direk- te Methode")	71
5.2.2 Bestimmung der Kallikreinaktivität mit Alko- hol-Dehydrogenase als Hilfsenzym	72
5.2.3 Bestimmung der Kallikreinaktivität am Auto- titrator	73
5.2.4 Bestimmung der Reinheit des DFP	73
5.2.5 Hemmung von Kallikrein durch DFP	74
5.2.6 Auswertung der kinetischen Experimente	75

5.2.7	Darstellung von DFP-32-Kallikrein und DFP-32-Trypsin	75
5.2.8	Partielle Säurehydrolyse von DFP-32-Kalli- krein und DFP-32-Trypsin	76
5.2.9	Abtrennung der stark sauren Peptide	76
5.2.10	Hochspannungselektrophorese	77
5.2.11	Autoradiographie	78
5.2.12	Elution der einzelnen Zonen	78
5.2.13	Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von Peptiden oder Proteinen	79
5.2.14	Bestimmung der Extinktionskoeffizienten und der Spontanhydrolyse von Cinnamoyl- und Indolacryloylimidazol	79
5.2.15	Differenzspektren	81
5.2.16	Bestimmung der Acylierungs- und Deacylie- rungsgeschwindigkeiten von Kallikrein mit Cinnamoyl- bzw. Indolacryloylimidazol	82
5.2.17	Bestimmung der Inaktivierungsgeschwindig- keit von Kallikrein durch Cinnamoylimidazol	83
5.2.18	Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von p-Nitrophenol	84
5.2.19	Bestimmung der Acylierungsgeschwindigkeit von Kallikrein durch NPGb mit der "stopped flow"-Apparatur	84
5.2.20	Titration von Kallikrein mit NPGb	85
6	Zusammenfassung	87
7	Literaturverzeichnis	89
	Lebenslauf	95

Abkürzungen

BAEE	α -N-Benzoyl-L-arginin-äthylester
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DFP-32	Diisopropylfluorophosphat- ³² P
DFP-32-Kallikrein	durch DFP-32 inaktiviertes Kallikrein
DFP-32-Trypsin	durch DFP-32 inaktiviertes Trypsin
DIP-	Diisopropylphosphoryl-
EDTA	Äthylendiamin-tetraessigsäure
NPGB	p-Nitrophenyl-p'-guanidinobenzoat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

1. Einleitung und Zielsetzung

Das Kallikrein-Kininogen-Kinin-System stellt einen physiologisch äußerst wirksamen Funktionskomplex mit hormonähnlichen Eigenschaften dar. Die weite Verbreitung und die hohe Wirksamkeit des Systems lassen erwarten, daß es von großer Bedeutung für die Physiologie und die Pathologie ist. Über seine Rolle im Organismus besteht aber noch weitgehend Unklarheit. Dies liegt vor allem daran, daß die Komponenten dieses Systems noch ungenügend charakterisiert sind.

Nachdem im Arbeitskreis von Werle Methoden zur Isolierung von reinen Kallikreinen des Schweins entwickelt worden waren, wurde mit Untersuchungen begonnen, die die nähere Aufklärung von Struktur und Wirkungsweise von Kallikrein, vor allem von Schweinepankreas-kallikrein als am leichtesten zugänglichen Modellvertreter dieser Gruppe, zum Ziel haben.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten hauptsächlich Untersuchungen zur Kenntnis des aktiven Zentrums von Kallikrein durchgeführt werden. Die Umsetzung von Kallikrein mit Diisopropylfluorophosphat sollte sich einerseits zum Vergleich der verschiedenen Kallikreine des Schweins untereinander und andererseits zum Vergleich der Aminosäuresequenz am aktiven Zentrum von Kallikrein mit der von anderen Serinproteinasen eignen.

Die Umsetzung von Kallikrein mit chromophore Gruppen tragenden Substraten sollte dazu dienen, den Acylenzym-Mecha-

nismus beim Kallikrein direkt nachzuweisen, und sollte außerdem Möglichkeiten zur Titration des aktiven Zentrums dieses Enzyms eröffnen.

2. Überblick über die bisherige Kenntnis der Enzymologie der Kallikreine

2.1. Die Enzyme der Kallikreingruppe

2.1.1. Historischer Überblick

Im Jahre 1925 fand E.K.Frey (vgl. Übersicht: Frey, Kraut und Werle et al. 1968), daß der Harn von Säugetieren eine Substanz enthält, die nach intravenöser Injektion beim Hund eine starke Blutdrucksenkung hervorruft. Bei weiteren Untersuchungen stellte sich heraus, daß die für diese hypotensive Wirkung verantwortliche Substanz in der Bauchspeicheldrüse in besonders großen Mengen vorkommt. Sie wurde deshalb Kallikrein genannt, abgeleitet von $\kappa\alpha\lambda\lambda\acute{\iota}\kappa\rho\epsilon\alpha\varsigma$, einer spätgriechischen Bezeichnung für Bauchspeicheldrüse, die neben $\pi\acute{\alpha}\gamma\kappa\rho\epsilon\alpha\varsigma$ vorkommt. E. Werle (1936) fand, daß durch Einwirkung von Kallikrein auf Serum eine Substanz entsteht, die den isolierten Meerschweinchendarm zu lebhaften Kontraktionen veranlaßt, während Kallikrein selbst nicht wirksam ist. Diese indirekte Wirkung von Kallikrein, sowie die Beobachtungen, daß Kallikrein nicht dialysierbar ist und durch Erhitzen im siedenden Wasserbad inaktiviert wird, ließen darauf schließen, daß es sich um ein Enzym und nicht um ein Hormon handelt. Dieses Enzym sollte mit einem im Serum enthaltenen Substrat reagieren und daraus ein auf die glatte Muskulatur einwirkendes Spaltprodukt freisetzen.

Das im Serum entstehende Spaltprodukt wurde Kallidin und die entsprechende Vorstufe Kallidinogen genannt. Diese Hypothesen konnten im Lauf der Zeit bestätigt werden.

Es ergab sich, daß Kallidin zu einer Gruppe von einander sehr ähnlichen Peptiden gehört, die aufgrund ihrer Fähigkeit, glatte Muskulatur, wie Uterus und Darm, zu kontrahieren, Kinine genannt wurden, abgeleitet vom griechischen κινέω, ich bewege. Die Kinine der Säugetiere erwiesen sich als Peptide mit 9 bis 11 Aminosäuren. Ihre Aminosäuresequenzen wurden von verschiedenen Arbeitskreisen aufgeklärt (Elliot et al.1960; Pierce et al.1961; Werle et al. 1961; Elliot et al.1965).

Aminosäuresequenzen der Kinine der Säugetiere

Bradykinin:

Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg

Kallidin:

Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg

Methionyl-lysyl-bradykinin:

Met-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg

2.1.2. Abgrenzung der Kallikreine gegenüber anderen Enzymen

Durch ihre Fähigkeit, Kinine freizusetzen, gekennzeichnete Kallikreine wurden in reichlicher Menge im Harn, Serum, Mundspeicheldrüsen, Darm und Pankreas gefunden. Es ergab sich, daß verschiedene Kallikreine zum Teil unterschiedli-

che Kinine liberieren, was bedeutet, daß die Kallikreine anscheinend eine recht heterogene Gruppe von Enzymen sind.

Das Bild wurde noch unübersichtlicher, nachdem Rocha e Silva (1949) festgestellt hatte, daß auch Trypsin aus Serum ein Kinin, das Bradykinin, freisetzt. Er entdeckte auch kininliberierende Hydrolasen in Schlangengiften, die er jedoch nicht als Kallikreine bezeichnete.

Die "Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry" (im folgenden mit EC abgekürzt) erteilte den Kallikreinen die Systemnummer EC 3.4.4.21. Dabei wurden Kallikreine als Enzyme definiert, die aus Kallidinogen Kallidin freisetzen.

Nach dieser Definition würde jedoch das Serumkallikrein nicht zur Gruppe der Kallikreine gehören, da es Bradykinin freisetzt (Webster et al. 1963; Habermann et al. 1964). Andererseits läßt sich aber auch die Kininfreisetzung als solche nicht zur Kallikreindeinition heranziehen, da z.B. Trypsin (und auch andere Proteinasen) auch Kinin freisetzt. Die Kininliberierung durch Trypsin wurde nur deswegen nicht schon früher erkannt, weil im Blut größere Mengen Trypsin-inhibitoren vorkommen, die sehr rasch wirken, während die ebenfalls dort auftretenden Kallikreininhibitoren wesentlich langsamer wirken. Demnach wären Kallikreine solche kininliberierende Enzyme (Kininogenasen), die durch Inhibitoren im Serum nicht oder nur langsam gehemmt werden.

Da aber auch diese Definition wenig befriedigend ist, schlugen einige Arbeitskreise, die auf dem Kallikrein-Kinin-Gebiet tätig sind, vor, nur solche Enzyme Kallikrein zu nennen, die von ihren Entdeckern so bezeichnet wurden. Nach dieser nur von historischen Gesichtspunkten geleiteten Definition wären die erwähnten Schlangengifthydrolasen nicht als Kallikreine zu bezeichnen. Da es sich aber bei den Giftdrüsen der Schlangen um entwicklungsgeschichtlich modifizierte Speicheldrüsen handelt, ist eine Verwandtschaft der darin auftretenden kininliberierenden Hydrolasen mit den Kallikreinen zu vermuten.

Diese historisch begründete Definition steht auch im Widerspruch zur erwähnten derzeit geltenden Definition der EC. Auch die anstehende Revision der Nomenklatur durch die EC dürfte dieses Problem nicht in zufriedenstellender Weise lösen können. Eine endgültige Festlegung dürfte erst nach weiteren Untersuchungen mit reinen Enzympräparaten möglich sein.

Während also eine allgemeine Abgrenzung der Gruppe der Kallikreine Schwierigkeiten bereitet, sind zumindest beim Schwein verschiedene Vertreter dieser Gruppe wohl definiert.

2.1.3. Die Kallikreine des Schweins

Am besten untersucht wurden bisher die Kallikreine des Schweins. Aus Pankreas und Serum dieser Species wurden

hochgereinigte Kallikreinpräparate isoliert (Fritz et al. 1967; Habermann et al. 1966).

Die beiden Enzyme, die von anderen proteolytischen Enzymen, wie Trypsin und Chymotrypsin bzw. Thrombin, völlig verschieden sind, weisen beträchtliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Molekulargewichte, ihrer Aktivität gegenüber verschiedenen Substraten, ihrer Hemmbarkeit durch verschiedene hochmolekulare Inhibitoren und hinsichtlich der Natur der durch sie freigesetzten Kinine auf (Übersicht: Frey, Kraut, Werle et al. 1968).

Vorläufige Untersuchungen, die durch Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, weisen darauf hin, daß zwischen den drei sogenannten Organ- oder Drüsenkallikreinen, Harn-, Submandibularis- und Pankreaskallikrein, größere Ähnlichkeiten bestehen, während sich Serumkallikrein von dieser Gruppe deutlich unterscheidet (Übersicht: Frey, Kraut, Werle et al. 1968).

2.2. Das Schweinepankreas-kallikrein

2.2.1. Eigenschaften

In der Hauptsache beschäftigen sich unsere Untersuchungen mit dem Kallikrein aus Schweinepankreas*, dessen bisher

* Wenn nicht anders vermerkt wird, so ist im weiteren Verlauf dieser Arbeit unter Kallikrein immer Schweinepankreas-kallikrein zu verstehen.

bekannte Eigenschaften im folgenden kurz zusammengefaßt werden.

Abgesehen von der erwähnten kininliberierenden Wirkung zeigt das Kallikrein noch weitere Ähnlichkeiten seiner enzymatischen Eigenschaften mit dem Trypsin. Beide Enzyme hydrolysieren α -N-acylierte Ester der basischen Aminosäuren Arginin (Werle et al.1960; Habermann 1959) und auch Lysin (Fiedler 1968) und beide werden vom aus Rinderorganen gewonnenen Kallikrein-Trypsin-Inhibitor (Kunitz-Inhibitor; Übersicht: Vogel et al.1966) gehemmt, während der Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen nicht auf Kallikrein wirkt (Übersicht: Vogel et al.1966). Beide Enzyme treten im Pankreas als inaktive Zymogene auf, werden in den Pankreassaft ausgeschieden und durch Trypsin in katalytisch aktive Enzyme umgewandelt (Übersicht: Frey, Kraut, Werle et al.1968).

Wie Trypsin, so wird auch Kallikrein durch DFP irreversibel gehemmt (Balls et al.1952; Fiedler et al.1969). Dabei wird ein einziger der insgesamt 17 Serinreste des Kallikrein-Moleküls (vgl. Tabelle I) phosphoryliert. Kallikrein gehört somit ebenfalls zur Gruppe der Serinproteinasen.

Jedoch bestehen eine Reihe von grundlegenden Unterschieden zwischen Kallikrein und Trypsin. Kallikrein vermag im Gegensatz zu Trypsin p-Nitranilide und Amide nicht zu spalten (Trautschold 1965) und ist vor allem keine Proteinase mit breiter Substratspezifität. Trautschold (1965) fand,

daß die proteolytische Aktivität des Trypsins z.B. gegenüber Casein mindestens 4×10^4 mal so hoch ist wie die der gleichen Gewichtsmenge Kallikrein. Selbst ein Teil dieser schwachen proteolytischen Aktivität des Kallikreins beruhte auf der Gegenwart von anderen Proteinasen als Verunreinigungen, wie mit Hilfe von Inhibitoren gezeigt werden konnte.

Tabelle I - Aminosäurezusammensetzung von Schweinekallikrein^a und Schweinetrypsin^b

Aminosäure	Anzahl der Aminosäuren pro Molekül	
	Kallikrein	Trypsin
Lys	13	10
His	10	3
Arg	4	4
Asp	33	24
Thr	18	10
Ser	17	25
Glu	28	17
Pro	20	10
Gly	27	24 - 25
Ala	16	15
Cys	10	12
Val	13	16
Met	5	2
Ile	14	12
Leu	24	12
Tyr	9	8
Phe	13	4
Trp	9	4

^a(Fritz et al.1967), ^b(Charles et al.1963; Neurath 1964)

In Bezug auf die Hemm- und Aktivierbarkeit durch Schwermetallionen zeigen sich Unterschiede zwischen beiden Enzymen (Fiedler et al.1968). Auch in der Aminosäurezusammensetzung unterscheiden sich Kallikrein und Schweinetrypsin grundlegend (vgl.Tabelle I). Rindertrypsin hat seinen isoelektrischen Punkt bei pH 10,8 (Cunningham 1954), Kallikrein bei 3,85 bis 4,4 (Werle et al.1940; Trautschold 1965; Habermann 1962; Fiedler et al.1970). Kallikrein ist im Gegensatz zu Trypsin ein Glykoprotein. Es enthält etwa 3% Glucosamin, 0,7% Galaktose, 2% Mannose, 1% Fucose, 0,3% Glucose und 0,8% Sialinsäuren (Fritz et al.1967).

Selbst hochgereinigte Präparationen von Schweinepankreas-kallikrein, die sich in der Ultrazentrifuge homogen verhalten, können durch Elektrophorese bei pH 8 in zwei Zonen aufgetrennt werden. Habermann (1962) nannte die schneller zur Anode wandernde Zone Kallikrein A, die langsamere Kallikrein B. Die beiden Fraktionen lassen sich auch durch Ionenaustauschchromatographie an Diäthylaminoäthyl-Cellulose trennen (Fiedler et al.1967).

Bisher wurden zwischen Kallikrein A und B weder bei den katalytischen Eigenschaften (Fiedler et al.1969; Fiedler, F., Leysath, G., und Werle, E., Manuskript in Vorbereitung), noch in der Aminosäurezusammensetzung (Fritz et al., unveröffentlichte Ergebnisse) Unterschiede festgestellt.

Bei der Elektrophorese auf Celluloseacetat-Folien bei pH 4,5 spaltet sich auch reines Kallikrein A oder B nochmals in mehrere enzymatisch aktive Zonen auf. Bei Elektrofokussierung im Ampholine-pH-Gradienten lassen sich auch diese einzelnen Fraktionen voneinander trennen. Die Unterfraktionen zeigen isoelektrische Punkte zwischen pH 4,05 und 3,60 (Fiedler et al.1970), wobei im Verhalten von Kallikrein A und B kein grundlegender Unterschied zu sehen ist. Diese Aufspaltung dürfte auf unterschiedliche Gehalte der einzelnen Fraktionen an Sialinsäure zurückzuführen sein, da nach Behandlung mit Neuraminidase nur mehr eine Zone gefunden wird (Fritz et al.1967; Fiedler et al.1970). Die Unterschiede zwischen Kallikrein A und B im elektrophoretischen Verhalten bleiben aber nach Neuraminidasebehandlung nach wie vor erhalten.

Da die Isolierung der elektrophoretisch aufgetrennten Fraktionen sehr umständlich und mit hohen Materialverlusten verbunden ist, wurden für die folgenden Untersuchungen in der Hauptsache Kallikrein A und neuraminidasebehandeltes Kallikrein B, das sich bei der Elektrophorese bei pH 5 und 8 als nahezu homogen erwies, verwendet.

2.2.2. Aktivitätseinheiten

Im Lauf der Zeit wurden für die Festlegung der Aktivität von Kallikreinen verschiedene Einheiten benützt. Die historisch älteste Kallikreineinheit (KE) war als diejenige Kallikreinmenge definiert, die bei intravenöser Injek-

tion an der Carotisdruckkurve eines Hundes die gleiche Wirkung hervorruft wie 5 ml Menschenharn, der einer Sammelprobe von 50 Liter entnommen und 24 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert worden ist (Frey, Kraut, Werle et al.1968).

Andere Möglichkeiten der Festlegung der Kallikreinaktivität ergaben sich aus dem Befund, daß Kallikreine esterolytische Eigenschaften besitzen. In dem von Trautschold et al.(1961) angegebenen Test wird BAEE als Substrat verwendet und das entstehende Äthanol mit Alkoholdehydrogenase als Hilfsenzym bestimmt. Entsprechend den Empfehlungen der EC wird dabei als 1 (internationale) Einheit (U) Kallikrein diejenige Menge bezeichnet, die unter diesen Testbedingungen 1 μ Mol BAEE pro Minute umsetzt. Für Schweinepankreas-kallikrein wurde gezeigt, daß 1 U Kallikrein etwa 10 KE entspricht (Fritz et al.1967).

Als zuverlässigste Bestimmungsmethode erwies sich die Verfolgung der BAEE-Spaltung am Autotitrator, wobei die Testbedingungen (5.2.3) von denen des oben erwähnten Testes abweichen. Dadurch ergeben sich etwas veränderte Zahlenwerte für die Aktivität von Kallikreinpräparationen. Die am Autotitrator bestimmten Kallikreineinheiten werden in der vorliegenden Arbeit als U_{AT} bezeichnet.

3. Untersuchung von Kallikreinen mittels Diisopropylfluorophosphat

3.1. Vergleich der Reaktionsfähigkeit verschiedener Kallikreine des Schweins

Habermann (1960) zeigte zuerst, daß Kallikrein ebenso wie Trypsin und Chymotrypsin durch DFP gehemmt wird. Aus unseren früheren Untersuchungen (Fiedler et al. 1969) ist zu entnehmen, daß bei der Umsetzung von Kallikrein mit DFP-32 radioaktiver Phosphor in das Enzym im Verhältnis 1:1 eingebaut wird, sodaß wie bei anderen Serinproteinasen folgende Reaktionsgleichung gilt



(E Enzym; I Inhibitor; E_i inaktiviertes Enzym).

Für die Geschwindigkeit der Hemmung durch DFP ergibt sich daraus

$$v = \frac{-d[E]}{dt} = k \cdot [E] \cdot [DFP]; (2)$$

bzw. für großen DFP-Überschuß mit $[DFP] = \text{const.}$; und

$$k' = k \cdot [DFP];$$

$$\frac{-d[E]}{dt} = k' \cdot [E]; (3)$$

und in integrierter Form

$$\ln [E] = \ln [E]_0 - k' \cdot t; (4).$$

Wir bestimmten die bimolekulare Geschwindigkeitskonstante k dieser Reaktion für Schweinepankreas-kallikrein B bei pH 7,2

(Tris- oder Phosphatpuffer; $I = 0,1; 0,05 \text{ M NaCl}; 0,1 \text{ mM Thioglykolat}; 25^\circ\text{C}$) zu $8,0 \pm 1,0 \text{ [M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}]$ (Fiedler et al. 1969). Fahrney et al.(1963)geben die entsprechende Konstante unter ähnlichen Bedingungen für Acetylcholinesterase mit $1,3\cdot 10^4$, Chymotrypsin $2,7\cdot 10^3$ und Trypsin $3,0\cdot 10^2 \text{ [M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}]$ an. Die Hemmung des Pankreaskallikreins erfolgt also mit einer im Vergleich zu den genannten anderen Serinhydrolasen deutlich unterschiedlichen Geschwindigkeit. Die Geschwindigkeitskonstante dieser irreversiblen Reaktion sollte sich deshalb zu einer Charakterisierung der katalytischen Eigenschaften verschiedener Kallikreine eignen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Klärung der Beziehungen der einzelnen Organkallikreine des Schweins untereinander die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten für die Kallikreine aus Harn und Submandibularisdrüsen und für verschiedene Formen des Pankreaskallikreins bestimmt (vgl. Tabelle II). Nur für die Pankreaskallikreine standen hochgereinigte Enzympräparate zur Verfügung, für die anderen Kallikreine hingegen nur angereicherte Präparate, an deren weiterer Reinigung an unserem Institut noch gearbeitet wird. Eine andere Charakterisierung der letztgenannten Präparate ist wegen mangelnder Reinheit zur Zeit nicht sinnvoll. Bei der irreversiblen Hemmung durch DFP sollten die Ansprüche an die Reinheit der untersuchten Enzympräparationen jedoch nicht so hoch sein, wenn diese nur keine nennenswerten Fremdaktivitäten gegenüber dem für die Hemmreaktion gewählten Substrat enthalten. Die eventuelle Gegenwart einer sol-

chen Fremdaktivität müßte sich in der Kinetik der Hemmreaktion bemerkbar machen, während eine etwaige Verunreinigung mit einem die Hemmreaktion mit DFP beeinflussenden Inhibitor sich in den Experimenten mit verschiedenen Enzymkonzentrationen bemerkbar machen müßte.

Wegen der Vergleichsmöglichkeiten mit anderen Serinhydrolasen wurde zur Untersuchung der Hemmgeschwindigkeit der verschiedenen Kallikreine durch DFP der pH-Wert 7,2 gewählt. Die verwendeten DFP-Präparate wurden nach Hydrolyse mit NaOH auf ihre Reinheit untersucht (5.2.4) und erwiesen sich dabei innerhalb der Fehlergrenzen der Bestimmungsmethode als rein. Die DFP-Konzentration wurde auf 1 mM festgesetzt, wie es sich nach unseren früheren Untersuchungen als günstig erwiesen hatte.

Aus den Inkubationsansätzen der Kallikreine mit DFP wurden in regelmäßigen Zeitabständen Proben entnommen, die mit Hilfe des Testes mit Alkoholdehydrogenase als Hilfsenzym (5.2.2) auf ihren Gehalt an noch aktivem Enzym untersucht wurden.

Alle untersuchten Kallikreinpräparate wurden durch DFP in einer zeitabhängigen Reaktion gehemmt (5.2.5). Bei der Auftragung der Logarithmen der restlichen Enzymaktivität gegen die Zeit entsprechend Gleichung (4) ergab sich in jedem Fall eine Gerade, wie in Abbildung 1 am Beispiel des Harnkallikreins gezeigt ist.

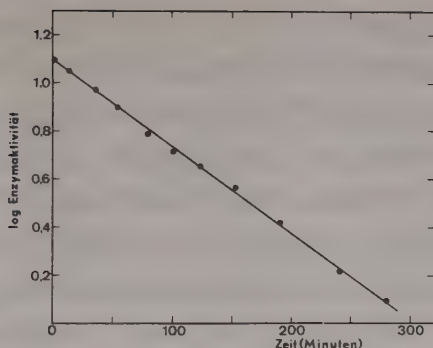


Abb.1 - Kinetik der Hemmung von Schweineharnkallikrein (isoliert nach Fritz et al.(1969)) durch Diisopropylfluorophosphat (0,1 M Phosphatpuffer; pH 7,20; 0,1 mM Thioglykolat; 25°C)

Demnach verläuft der Inaktivierungsprozeß nach 1.Ordnung in Bezug auf das Enzym, wie wir früher schon mit neuraminidasebehandeltem Schweinepankreas-kallikrein B zeigten (Fiedler et al.1969). Bei keiner der untersuchten Enzympräparationen wurden Abweichungen von dieser Kinetik beobachtet, was die Abwesenheit von störenden enzymatischen Verunreinigungen zeigt. Die Hemmreaktion kann daher quantitativ durch die Geschwindigkeitskonstante 1.Ordnung k' beschrieben werden, die in Gleichung (3) definiert ist.

Da die vorliegenden Untersuchungen nur bei einer einzigen DFP-Konzentration durchgeführt wurden, wurde diese Konstante anstelle der in einer früheren Arbeit (Fiedler et al.1969) verwendeten bimolekularen Geschwindigkeitskonstante angegeben.

Die berechneten Standardfehler von k' der Einzelexperimente waren im allgemeinen erheblich geringer als die interexperimentellen Unterschiede. Es ergaben sich jedoch keine Anzeichen für eine Korrelation zwischen k' und der eingesetzten Enzymmenge als Hinweis auf eine eventuelle Anwesenheit eines störenden Hemmstoffes. Die Ergebnisse wurden deshalb als der Mittelwert und dessen Standardfehler aus mehreren Experimenten angegeben und sind in Tabelle II zusammengestellt.

Tabelle II - Geschwindigkeitskonstanten 1.Ordnung für die Hemmung verschiedener Schweinekallikreine durch 1,0 mM Diisopropylfluorophosphat (0,1 M Natriumphosphatpuffer; pH 7,20; 0,1 mM Thioglykolat; 25,0°C).

Enzympräparat	Spezif. Aktiv. [U/mg]	Anzahl der Versuche	$(k' \pm \sigma) \cdot 10^3$ [min ⁻¹]
Pankreaskallikrein A ^{ab}	125	7	$9,4 \pm 2,0$
neuraminidasebehandeltes Pankreaskallikrein B ^{abc}	135	7	$8,6 \pm 2,2$
Submandibulariskallikrein ^d	60	9	$6,9 \pm 0,9$
Submandibulariskallikrein ^e	17	5	$8,8 \pm 2,0$
Harnkallikrein ^e	17	11	$7,0 \pm 1,5$

Isolationsmethoden: ^a(Fritz et al.1967); ^b(Fiedler et al. 1967); ^c(Fiedler et al.1970); ^d(Werle et al.1963); ^e(Fritz et al.1969).

Ein Vergleich der Werte der Geschwindigkeitskonstanten für die Hemmung verschiedener Schweinekallikreine durch DFP zeigt, daß diese innerhalb der Fehlergrenzen der Messungen gleich sind. Die Übereinstimmung der Konstanten für die beiden nach verschiedenen Verfahren isolierten Submandibularis-kallikrein-Präparate unterschiedlicher spezifischer Aktivität belegt ebenfalls den ausreichenden Reinheitsgrad der untersuchten Enzyme. Das bei den vorliegenden Untersuchungen erhaltene Resultat für neuraminidasebehandeltes Pankreas-kallikrein B stimmt befriedigend mit dem früher (Fiedler et al.1969) erhaltenen Wert ($k' = (8 \pm 1) \cdot 10^{-3} [\text{min}^{-1}]$) überein. Aus der Übereinstimmung der Geschwindigkeitskonstanten der DFP-Hemmung für die verschiedenen Kallikreine unterschiedlicher Herkunft kann der Schluß gezogen werden, daß der Hemmechanismus bei allen untersuchten Enzymen der gleiche ist und in der irreversiblen Reaktion eines einzigen Serinmoleküls im aktiven Zentrum des Kallikreins mit einem DFP-Molekül besteht, wie früher für das Pankreasenzym gezeigt wurde (Fiedler et al.1969), und daß die aktiven Zentren aller dieser Kallikreine einander sehr ähnlich, wenn nicht identisch sind. Selbst kleine Unterschiede der aktiven Zentren etwa der Serinproteinasen Trypsin und Chymotrypsin (vgl.Zusammenfassung: Kasserra et al.1969) führen zu großen Unterschieden in der Reaktivität dieser Enzyme gegenüber DFP (Fahrney et al.1963).

Nach den bisherigen Befunden erscheint die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß die Kallikreine des Schweins - mit Ausnahme des Serumenzyms - eine weitgehend identische Aminosäuresequenz aufweisen, und daß die Unterschiede im Aufspaltungsmuster bei der isoelektrischen Fraktionierung (Fiedler et al.1970, 1970a), in den serologischen Eigenschaften (Frey, Kraut, Werle et al.1968) und in der Blutdruckwirksamkeit (Trautschold et al.1961) - soweit sie nicht auf Verunreinigungen in den bisher erhaltenen Enzympräparationen zurückzuführen sind - die Folgen eines unterschiedlichen Kohlenhydratgehalts an der Peripherie des Kallikreinmoleküls darstellen. Jedenfalls unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Einordnung dieser Kallikreine in eine gemeinsame Gruppe, für die die Namen Organ-oder Drüsenkallikreine gebräuchlich sind.

3.2. Vergleich von Aminosäuresequenzen des aktiven Zentrums von Schweinepankreas-kallikrein mit denen anderer Serinproteinasen

3.2.1. Die Aminosäuresequenz um das Serin im aktiven Zentrum von Serinproteinasen

In den letzten Jahren wurden zwei Klassen von Serinproteinasen beschrieben (Dixon 1966; Neurath et al.1967; Hartley 1970). Eine Gruppe umfaßt die Pankreasproteinasen mit der Sequenz Asp-Ser-Gly im aktiven Zentrum und vielen Disulfidbrücken, z.B. Trypsin und Chymotrypsin, die andere

besteht aus Proteinasen von Mikroorganismen mit der Sequenz Thr-Ser-Met und mit wenigen oder gar keinen Disulfidbrücken, z.B. Subtilisin aus *Bacillus subtilis* (Sanger et al.1960). Beim Vergleich der vollständigen Aminosäuresequenzen von Enzymen aus beiden Gruppen stellt man keine strukturellen Homologien fest, womit es wenig wahrscheinlich erscheint, daß sich beide Gruppen aus einem gemeinsamen "Urenzym" entwickelt haben (Smith et al.1966).

Die Einteilung in Serinproteinasen aus tierischen Organismen und aus Mikroorganismen wird durch die α -lytische Protease aus *B. Sorangium* durchbrochen (Whitacker et al.1967). Dieses Enzym weist nämlich die Sequenz Asp-Ser-Gly auf und zeigt auch sonst Homologien zu den Pankreasproteinasen.

Außer den Proteinasen, die gegenüber Aminosäureestern auch eine sehr beträchtliche esterolytische Aktivität entfalten, gehört zu den Serinhydrolasen auch eine Gruppe von Esterasen ohne proteolytische Aktivität mit der Sequenz Glu-Ser-Ala, z.B. Aliesterase aus Pferdeleber, Acetylcholinesterase aus *Elektrophorus electricus* und Serumcholinesterase (Übersicht: Oosterbaan et al.1964).

Es erschien von Interesse festzustellen, zu welcher dieser Gruppen das von uns hauptsächlich bearbeitete Schweinepankreas kallikrein gehört. Eine gewisse Ähnlichkeit zwischen

Kallikrein und Subtilisin schien zunächst aufgrund erster orientierender Messungen des Differenzspektrums von Indol-acryloylkallikrein gegen Kallikrein nicht ausgeschlossen. Es gab aber schon ungleich mehr Hinweise, daß Kallikrein dem Trypsin ähnlicher ist (2.2.1).

3.2.2. Elektrophoretische Auftrennung von DFP-32-Kallikrein-hydrolysaten

Für einen Vergleich der kurzen Sequenzen um das Serin im aktiven Zentrum von Kallikrein und Trypsin bietet sich das Verfahren von Naughton et al. (1960) an. Dabei werden Partialhydrolysate von mit radioaktivem DFP umgesetzten Enzymen hochspannungselektrophoretisch aufgetrennt und die Wanderungsgeschwindigkeiten der einzelnen radioaktiven Zonen miteinander verglichen.

Kallikrein A, neuraminidasebehandeltes Kallikrein B und Trypsin wurden mit DFP-32 umgesetzt (5.2.7) und unter schonenden Bedingungen mit Salzsäure hydrolysiert (5.2.8). Die Hydrolysate wurden dann so auf Papier aufgesetzt, daß sich die einzelnen Banden überlappten, um störende Einflüsse von lokalen Spannungs- oder Temperaturdifferenzen auszuschließen. Ein typisches Beispiel eines nach Hochspannungselektrophorese bei pH 3,5 (5.2.10) erhaltenen Autoradiogrammes (5.2.11) ist in Abbildung 2 zu sehen. Man erkennt daraus, daß 12 radioaktive Banden auftreten, die bei allen 3 Hydrolysaten auch an den Überlappungsstellen genau übereinstimmen.

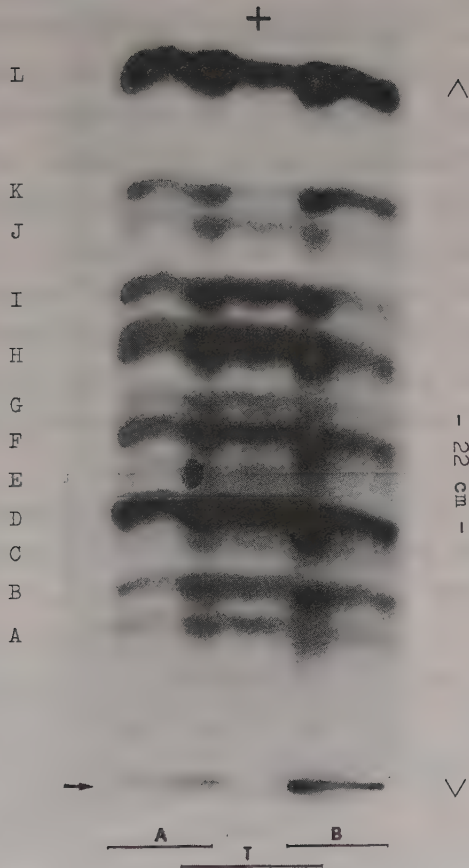
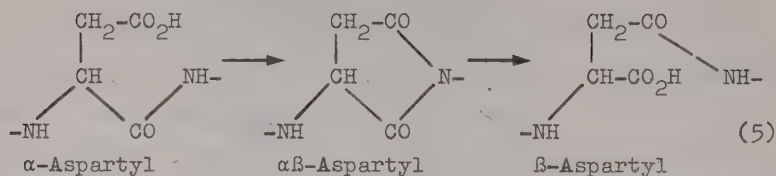


Abb.2 - Autoradiogramm von Partialhydrolysaten von DFP-32-Kallikrein A (A), DFP-32-Trypsin (T) und DFP-32-Kallikrein B (B) nach Auftrennung durch Hochspannungselektrophorese bei pH 3,5 (2 Stunden Laufzeit, 1600 V, 15 mA) (5.2.10 und 5.2.11).

Naughton et al.(1960) konnten für die entsprechenden Chymotrypsin- und Trypsinhydrolysate zeigen, daß die einzelnen radioaktiven Banden auf Hydrolyseprodukte zurückzuführen sind, die aus der kurzen Sequenz Asp-Ser(DIP)-Gly im aktiven Zentrum entstehen. Zur Erklärung dafür, daß aus dieser relativ einfachen, für Chymotrypsin und Trypsin gesicherten Sequenz eine so überraschend große Anzahl von Banden entsteht, geben Naughton et al.(1960) zwei Gründe an:

1. Die Isopropylgruppen des Diisopropylphosphatrestes werden unter den Hydrolysebedingungen nur teilweise abgespalten, sodaß Diisopropylphosphat-, Monoisopropylphosphat- und Phosphatderivate auftreten.
2. Während der Säurehydrolyse können α -Aspartylreste nach folgendem Schema in $\alpha\beta$ -Aspartyl- und β -Aspartylreste umgewandelt werden:



Die Tatsache, daß 12 bei der partiellen Säurehydrolyse der verschiedenen DFP-32-Enzyme entstandene Produkte bei der Hochspannungselektrophorese genau gleich schnell wandern, spricht stark dafür, daß auch Kallikrein im aktiven Zentrum die Sequenz Asp-Ser-Gly aufweist. Auch die Hochspannungselektrophorese bei pH 6,5 (5.2.10) ergab nach Autoradiographie übereinstimmende Banden, wenn auch die Auftrennung bei diesem pH-Wert nicht so gut wie bei pH 3,5 ist.

3.2.3. Untersuchung der Aminosäurezusammensetzung der einzelnen radioaktiven Zonen

Es wurde weiterhin versucht, die Aminosäurezusammensetzung der einzelnen radioaktiven Zonen zu ermitteln. Dazu wurden etwa 0,1 μ Mol DFP-32-Kallikrein (5.2.7) partiell mit Salzsäure hydrolysiert (5.2.8). Zur Isolierung der stark sauren Peptide wurde das Hydrolysat über eine Dowex 50-Säule gegeben (5.2.9), um eine Überladung des Papiers bei der anschließenden Hochspannungselektrophorese bei pH 3,5 zu vermeiden. Nach Autoradiographie (5.2.11) traten die gleichen Banden wie bei nicht mit Dowex 50 behandeltem Material auf.

Die am stärksten radioaktiven Banden B, D, F, H, I und J wurden eluiert (5.2.12) und anschließend einzeln der Relektrophorese bei pH 6,5 unterzogen (5.2.10). Dabei spalteten die Banden D und I jeweils zweifach auf, was entweder auf nicht vollständige Auftrennung bei pH 3,5 oder auf eine bei pH 6,5 eintretende Umwandlung (Naughton et al. 1960) zurückzuführen ist. Die schneller wandernden Zonen wurden mit D_1 bzw. I_1 bezeichnet.

Die Banden wurden wieder eluiert (5.2.12) und ihre Aminosäurezusammensetzung nach Totalhydrolyse bestimmt (5.2.13).

Die Aminosäurezusammensetzung der einzelnen Banden ist in Tabelle III angegeben. Wie man daraus entnehmen kann, entsprechen die einzelnen Banden keinen reinen Peptiden, da

die Aminosäuren nicht in ganzzahligen Verhältnissen auftreten, auch wenn man berücksichtigt, daß unter den Hydrolysebedingungen mit Serinverlusten zu rechnen ist.

Tabelle III - Aminosäurezusammensetzung der einzelnen Banden (Erläuterung siehe Text)

	nMol Aminosäuren						
	B	D ₁	F	H	I ₁	I ₂	J
Asp	4,5	4,6	4,1	7,7	1,1	2,3	1,6
Thr	3,5	3,5	1,5	2,6	0,6	1,2	0,7
Ser	13,9	19,1	5,5	14,5	2,7	6,4	2,8
Glu	2,3	3,8	3,4	9,4	4,9	4,6	1,8
Gly	9,4	11,8	6,6	10,3	2,2	3,8	3,0
Ala	4,5	5,1	1,9	3,8	0,8	1,9	1,0
Val	2,5	0,2	-	1,4	-	-	-
Ile	1,9	1,3	-	1,1	-	0,4	-
Leu	2,2	1,5	1,2	1,4	-	0,5	0,5
Tyr	1,5	0,9	-	0,4	-	-	-
Phe	1,4	0,7	-	0,6	-	-	-

Aus Tabelle I (vgl. S.8) geht hervor, daß Kallikrein wesentlich mehr saure Aminosäuren, vor allem Glutaminsäure, als Trypsin enthält. Bei der partiellen Hydrolyse könnte deshalb eine Reihe von sehr sauren Peptiden entstehen, die eine vergleichbare Wanderungsgeschwindigkeit wie die phosphathaltigen Peptide aufweisen.

Die Aminosäurezusammensetzung der einzelnen Banden beim Kallikrein könnte auf eine Sequenz Asp-Ser-Gly im aktiven

Zentrum mit Verunreinigungen durch glutaminsäurehaltige Peptide zurückzuführen sein, sie schließt aber auch ein aus Glu, Ser und Ala bestehendes Peptid nicht aus. In Analogie zu den oben erwähnten Beispielen wäre dann eine Sequenz Glu-Ser-Ala am wahrscheinlichsten.

Die Tatsache, daß das oben erwähnte "Peptidmuster" von DFP-Kallikrein mit dem von DFP-Trypsin übereinstimmt, spricht jedoch stark für die Sequenz Asp-Ser-Gly im aktiven Zentrum von Kallikrein. Ein mit der gleichen Arbeitstechnik durchgeführter Vergleich von Chymotrypsin mit Pferdeleberesterase (Glu-Ser-Ala) und Subtilisin (Thr-Ser-Met) zeigte deutliche Unterschiede in Zahl und Anordnung der einzelnen radioaktiven Banden (Sanger et al. 1960).

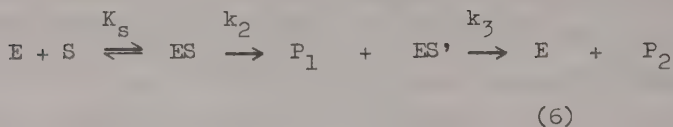
Weitere Untersuchungen zu einer endgültigen Klärung der Sequenz am aktiven Serinrest des Kallikreins erschienen im Rahmen dieser Arbeit als nicht angebracht, da in unserem Institut derzeit die Sequenzanalyse von Kallikrein in Angriff genommen wird.

4. Katalysemechanismus und aktives Zentrum des Schweinepankreasalkalikreins

4.1. Der Acylenzymmechanismus

4.1.1. Serinhydrolasen

Für die durch Serinhydrolasen katalysierte Spaltung von Estern, Amiden und Peptiden wird allgemein folgendes Reaktionsschema angenommen



(ES Michaelis-Menten-Komplex; ES' Acylenzym; P_1 und P_2 Produkte).

Der im ersten Schritt gebildete Michaelis-Menten-Komplex wird im zweiten Schritt unter irreversibler Freisetzung eines Produktes P_1 ("leaving group"; bei der Esterhydrolyse z.B. ein Alkohol) in ein Acylenzym umgewandelt, wobei der Serinrest im aktiven Zentrum mit dem Säurerest des Substrates verestert ist. Schließlich folgt die Spaltung des Acylenzyms unter Regenerierung des freien Enzyms und Freisetzung des Produktes P_2 (bei der Esterhydrolyse z.B. eine Säure).

Das obige Schema ist jedoch nur als "Minimalschema" aufzufassen. Es werden noch eine Reihe von der Bildung des Acyl-

Enzyms vorgeschalteten Schritten diskutiert, z.B. die Bildung eines tetraedrischen Zwischenproduktes (Caplow 1969), Protonierungsreaktionen ("pretransition state protonation", Wang et al. 1967) und Umlagerungen des Enzyms (Barmann et al. 1966).

Während man bei der Hydrolyse von Peptidsubstraten durch Serinhydrolasen über keinen direkten Beweis für die Gültigkeit dieses Schemas verfügt, gibt es bei Esterhydrolysen eine Reihe von Hinweisen dafür.

Eine starke Stütze für diesen Mechanismus wird in der Tatsache gesehen, daß eine Reihe von Benzoyl- und Tosylargininestern mit verschiedenen Alkoholresten von Trypsin (Schwert et al. 1949; Baines et al. 1964) und zum Teil auch vom Thrombin (Curagh et al. 1964) mit der gleichen maximalen Geschwindigkeit gespalten werden. Diese Tatsache wird meist dadurch erklärt, daß die Deacylierung eines Acylenzym-Zwischenproduktes langsamer als die anderen Reaktionen abläuft und deshalb geschwindigkeitsbestimmend wird. Einige Autoren nehmen allerdings an, daß andere, oben erwähnte vorgeschaltete Schritte geschwindigkeitsbestimmend sind (Barmann et al. 1966; Fink et al. 1969).

Bei verschiedenen Serinhydrolasen konnten Acylenzym-Zwischenprodukte bei Verwendung von Substraten mit chromophoren Acylestern spektralphotometrisch nachgewiesen werden, z.B. Cinnamoyl- und Indolacryloylderivate von Tryp-

sin, Chymotrypsin und Subtilisin (Bender et al.1962, 1962a; Oliver et al.1967; Bernhard et al.1965). Die spektralen Eigenschaften dieser Zwischenprodukte konnten nicht einwandfrei gedeutet werden. Nur im denaturierten Zustand entsprechen die Spektren der Acylenzyme dem des entsprechenden Serinesters, während sie im nativen Zustand deutlich davon verschieden sind (Bender et al.1962,1962a).

Man vermutete zunächst, daß der Acylrest im nativen Zustand am Imidazolring eines Histidinrestes gebunden ist und erst bei der Denaturierung an den Serinrest wandert, da die Spektren der entsprechenden Imidazolester noch am ehesten mit denen der nativen Acylenzyme übereinstimmen. Dagegen sprach jedoch, daß bei niedrigen pH-Werten die Acylenzyme wesentlich langsamer als die entsprechenden Imidazolester hydrolysiert werden (Bender et al.1962; Bernhard et al. 1965). Inzwischen konnte durch Röntgenstrukturuntersuchungen zumindest beim Tosyl- und Indolacryloylchymotrypsin gezeigt werden, daß die Acylgruppe schon im nativen Zustand des Enzyms an den Serinrest im aktiven Zentrum gebunden ist (Sigler et al.1968; Henderson 1970).

Ein weiterer starker Hinweis für das obige Schema (6) bei der Reaktion von Serinhydrolasen mit Estern wurde dadurch erhalten, daß man bei der Spaltung bestimmter Estersubstrate mit einer chromophoren Alkoholgruppe spektralphotometrisch einen biphasischen Verlauf der Freisetzung des

Alkohols nachweisen konnte. Die beiden Phasen entsprechen dabei der Acylierungs-, bzw. der Deacylierungsreaktion.

Substrate, die stöchiometrisch mit dem aktiven Zentrum von Serinhydrolasen unter Bildung eines Acylenzyms reagieren, das vergleichsweise sehr langsam deacyliert, wurden in den letzten Jahren häufig zur Titration der aktiven Zentren von Enzymen verwendet (Übersicht: Bender et al.1966).

4.1.2. Kallikrein

Im Gegensatz zu den Befunden beim Trypsin wurde festgestellt, daß beim Kallikrein k_{cat} für Ester mit verschiedenen Alkoholresten unterschiedlich ist (Werle et al.1969). Diese Ergebnisse erlauben daher keine Aussage darüber, ob die durch Kallikrein katalysierten Hydrolysereaktionen ebenfalls über einen Acylenzym-Mechanismus ablaufen.

Ein erster Hinweis für diesen Mechanismus war durch unseren Befund gegeben, daß auch beim Kallikrein ein einziger Serinrest mit DFP unter vollständiger Hemmung des Enzyms reagiert (Fiedler et al.1969), was der Bildung des Acylenzyms entspricht.

Es wurde versucht, weitere Stützen für das Vorliegen eines Acylenzym-Mechanismus beim Kallikrein beizubringen. Dazu wurde die Reaktion von Cinnamoyl- und Indolacryloylimidazol mit Kallikrein untersucht, in der Hoffnung auch hier Acyl-

enzyme direkt nachweisen zu können. Aus dem Vergleich der spektralen Eigenschaften von Acylkallikreinen mit denen anderer Acylenzyme, sowie der Geschwindigkeitskonstanten der Acylierung und Deacylierung wurden Hinweise auf Ähnlichkeit im Bau des aktiven Zentrums von Kallikrein mit denen anderer Serinhydrolasen erwartet.

Weiterhin wurde die Umsetzung verschiedener p-Nitrophenylester mit Kallikrein untersucht, mit dem Ziel ein geeignetes Substrat zu finden, mit dem sich die Bildung eines Acylenzym-Zwischenproduktes durch einen biphasischen Verlauf der Freisetzung von p-Nitrophenol demonstrieren läßt.

Aufgabe dieser Untersuchungen war es außerdem, ein für die Titration des aktiven Zentrums von Kallikrein geeignetes Reagens zu finden, da wegen der bestehenden Unsicherheiten über das Molekulargewicht eine Überprüfung der bisherigen Befunde mit einer unabhängigen Methode dringend geboten erscheint.

4.2. Umsetzung von Kallikrein mit Cinnamoyl- und Indolacryloylimidazol

4.2.1. Kinetische Konstanten der Reaktion

Zur Überprüfung der Arbeitsweise und des verwendeten Spektralphotometers wurden zunächst die Spektren von Cinnamoyl- und Indolacryloylimidazol aufgenommen (5.2.14).

Der molare Extinktionskoeffizient von Cinnamoylimidazol bei

pH 5,2 im Maximum von 308 ± 1 nm wurde zu $25\,300 \pm 1000$ $[M^{-1}.cm^{-1}]$ bestimmt. Der Wert stimmt gut mit den Literaturangaben von 25 200 (Bender et al.1962) und 25 000 (Bernhard et al.1965) überein. Eine andere Angabe von 23 400 (Oliver et al.1967) liegt etwas tiefer.

Nach Hydrolyse von Cinnamoylimidazol zu Cinnamationen in 0,1 N NaOH (5.2.14) ergab sich ein molarer Extinktionskoeffizient von $20\,500 \pm 700$ $[M^{-1}.cm^{-1}]$ bei 270 nm, was mit den Literaturangaben von 20 000 (Bernhard et al.1965) und $20\,300 \pm 200$ (Schonbaum et al.1961) übereinstimmt.

Da nur eine geringe Menge von Indolacryloylimidazol zur Verfügung stand, konnte nur eine einzige Stammlösung in Acetonitril hergestellt werden. Es ergaben sich Werte von $\lambda_{max} = 379 \pm 1$ und $\epsilon_{max} = 25\,500 \pm 600$ $[M^{-1}.cm^{-1}]$, während in der Literatur 30 000 (Bernhard et al.1965) und 26 200 (Oliver et al.1967) bei 378 nm angegeben sind.

Acylierung

Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Acylierung von Kallikrein A und B durch Cinnamoyl- und Indolacryloylimidazol (5.2.16) wurde der pH-Wert 5,2 gewählt. Die Acylierungsreaktionen verlaufen bei diesem pH-Wert mit ausreichender Geschwindigkeit. Die Deacylierungsgeschwindigkeit ist beim Cinnamoylkallikrein nur gering und ist beim Indolkallikrein nicht mehr meßbar. Ein weiterer Grund für die Wahl

dieses pH-Wertes war die Vergleichsmöglichkeit mit den Acylierungskonstanten anderer Serinhydrolasen, die ebenfalls bei pH 5,2 gemessen worden sind (Bender et al.1962a).

Eine Spontanhydrolyse von Indolacryloylimidazol bei pH 5,2 war nicht meßbar, während Cinnamoylimidazol langsam hydrolysiert wurde. Unter unseren Reaktionsbedingungen (5.2.14) ergab sich für diese Reaktion eine Geschwindigkeitskonstante 1.Ordnung von $k_{\text{hydr}} = (1,39 \pm 0,024) \cdot 10^{-4} \text{ [sec}^{-1}\text{]}$. Dieser Wert stimmt gut mit der von Schonbaum et al.(1961) bestimmten Konstante von $1,76 \cdot 10^{-4}$ für pH 5,05 überein, wenn man berücksichtigt, daß die Hydrolysegeschwindigkeit von Cinnamoylimidazol mit abnehmenden pH-Werten zunimmt (Bender et al.1962).

Zur Bestimmung der Acylierungsgeschwindigkeit von Kallikrein durch Indolacryloylimidazol (Cinnamoylimidazol) wurde die Substratabnahme bei 410 (335) nm verfolgt. Bei dieser Wellenlänge hat das Substrat noch etwa 51 (40) % seiner maximalen Absorption, das Acylkallikrein hingegen nur etwa 3 (5) %.

Die Werte für die Acylierungskonstanten wurden aus den gleichen Experimenten, die zur Aufnahme der Differenzspektren dienten, gewonnen. Um die kinetische Behandlung der Reaktion zu vereinfachen, wurde versucht, einen möglichst großen Enzymüberschuß über das Substrat zu verwenden. In der Praxis

wurde aber nur ein etwa sechsfacher Enzymüberschuß erreicht. Die Wahl dieses Verhältnisses wurde einerseits von der Empfindlichkeit des verwendeten Cary-Spektralphotometers und der starken Absorption des Enzyms im Absorptionsbereich des Cinnamoylimidazols und andererseits von der relativ geringen zur Verfügung stehenden Enzymmenge bestimmt.

In Analogie zu den Verhältnissen bei anderen Serinhydrolasen wurde die Acylierungsreaktion folgendermaßen formuliert



(E Enzym; AI Acylimidazol; AE Acylenzym; I Imidazol).

Die im Vergleich zur Acylierungsreaktion langsame Deacylierung tritt bei den zur Verfolgung der Abnahme der Substratkonzentrationen gewählten Wellenlängen nicht in Erscheinung. Die durch die Deacylierungsreaktion regenerierten geringen Mengen des freien Enzyms sind unter den Bedingungen eines großen Enzymüberschusses vernachlässigbar.

Aus der obigen Reaktionsgleichung (7) folgt demnach die Geschwindigkeitsgleichung

$$\frac{-d[AI]}{dt} = k_{ac} \cdot [E] \cdot [AI]; \quad (8)$$

Unter der Voraussetzung eines großen Enzymüberschusses ergibt sich die Vereinfachung $[E] = \text{const.}$; und daraus mit

$$k'_{ac} = k_{ac} \cdot [E];$$

$$\frac{-d[AI]}{dt} = k'_{ac} \cdot [AI]; (9).$$

Durch Integration erhält man

$$\ln [AI] = \ln [AI]_0 - k'_{ac} \cdot t; (10).$$

Der hier abgeleitete Fall sollte bei den Versuchen mit Indolacryloylimidazol vorliegen, das im Reaktionsmilieu keine Spontanhydrolyse zeigt. Bei der Auftragung von $\log(A_t - A_\infty)$ (A_t Extinktion zur Zeit t ; A_∞ Extinktion zur Zeit unendlich) gegen die Zeit sollte sich demnach eine Gerade ergeben, aus deren Richtungsfaktor sich k'_{ac} entnehmen läßt. Wie die Abbildung 3 zeigt, liegen die experimentell bestimmten Punkte über zwei Halbwertszeiten hinweg (75% Substratumsatz) auch erwartungsgemäß auf einer Geraden.

Bei der entsprechenden Acylierung mit Cinnamoylimidazol muß dagegen die Spontanhydrolyse dieser Verbindung berücksichtigt werden. Dies führt zu dem Ansatz

$$\frac{-d[CI]}{dt} = k_{ac} \cdot [E] \cdot [CI] + k_{hydr} \cdot [CI]; (11)$$

und nach Integration mit $[E] = \text{const.}$; und $k'_{ac} = k_{ac} \cdot [E]$;

$$\ln [CI] = \ln [CI]_0 - (k'_{ac} + k_{hydr}) \cdot t; (12).$$

Abbildung 3 zeigt, daß sich auch hier bei der Auftragung von $\log(A_t - A_\infty)$ gegen die Zeit über zwei Halbwertszeiten hinweg eine Gerade ergibt, aus deren Richtungsfaktor mit Hilfe

der früher bestimmten Konstanten k_{hydr} die pseudomonomolekulare Geschwindigkeitskonstante k'_{ac} gewonnen werden kann.

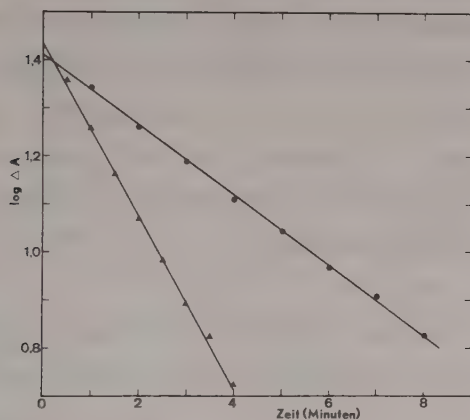


Abb. 3 - Kinetik der Acylierung bei pH 5,2 von neuraminidase-behandeltem Kallikrein B ($1,95 \cdot 10^{-5} \text{M}$) durch Cinnamoylimidazol ● ($3,23 \cdot 10^{-6} \text{M}$) und Indolacryloylimidazol ▲ ($2,95 \cdot 10^{-6} \text{M}$)

Die Annahme $[E] = \text{const.}$ ist bei allen hier durchgeführten Acylierungsversuchen nur annähernd erfüllt, da nach einem Umsatz über zwei Halbwertszeiten des Acylimidazols bei einem anfänglichen sechsfachen Enzymüberschuß die Konzentration des Kallikreins um etwa 12% abgesunken ist. Über die Reaktionszeit gemittelt liegt die effektive Konzentration des Enzyms dann aber nur etwa 6% unter der Anfangskonzentration. Die zu erwartenden Abweichungen sind also relativ gering. Experimentell ließ sich auch keine Abweichung der

Kurve $\ln \Delta A$ gegen t von einer Geraden beobachten (vgl. Abb. 3).

Auch die Kleinheit der Fehler der durch Ausgleichrechnung gewonnenen Geschwindigkeitskonstanten der Acylierung (vgl. Tabelle IV) von Kallikrein B durch Cinnamoylimidazol und Indolacryloylimidazol aus Einzelexperimenten deutet darauf hin, daß eine Behandlung der Reaktion nach Gleichung (10) bzw. (12) gerechtfertigt ist. Der Standardfehler von k_{ac} für Kallikrein A, der aus 4 unabhängigen Messungen gewonnen wurde, gibt einen Hinweis auf die Streuung der Ergebnisse aus verschiedenen Experimenten.

Diese Ergebnisse zeigen auch, daß ein Enzym-Substrat-Komplex vom Michaelis-Menten-Typ unter den verwendeten Reaktionsbedingungen keine Rolle spielt. Falls wirklich ein vorgelagertes Gleichgewicht vorliegt, so muß K_m wesentlich höher als die in den Untersuchungen verwendeten Acylimidazolkonzentrationen von etwa $3 \mu M$ liegen.

In Tabelle IV sind zum Vergleich auch Acylierungskonstanten von anderen Serinhydrolasen, die unter ähnlichen Reaktionsbedingungen gewonnen sind, angegeben.

Deacylierung

Bei pH 5,2 blieb die Absorption von Indolacryloylkallikrein im Maximum von 353 nm nach Ablauf der ersten 30 Minuten der beschriebenen Acylierungsreaktion mindestens weitere 30 Minuten konstant. Beim Cinnamoylkallikrein trat jedoch während

dieser Zeit eine geringfügige Absorptionsabnahme ein, wenn die Reaktion nahe dem Absorptionsmaximum bei 300 nm gemessen wurde. Deutet man diese Abnahme als die Deacylierung von Cinnamoylkallikrein, einer Reaktion 1.Ordnung, so erhält man den in Tabelle IV angegebenen Wert für die Geschwindigkeitskonstante der Deacylierung, der jedoch aufgrund der nur kleinen Extinktionsunterschiede nur ziemlich ungenau sein kann.

Erhöhte man den pH-Wert des Reaktionsgemisches (nachdem sich das Acylenzym in den ersten 30 Minuten nach dem Mischen von Enzym und Substrat gebildet hatte) durch Zugabe von konzentriertem Tris-Puffer (5.2.16) auf pH 8,8, so konnte eine rasche Extinktionsabnahme im Maximum des Acylenzyms festgestellt werden.

Für die Reaktion sollte folgende Geschwindigkeitsgleichung gelten

$$\frac{-d[AE]}{dt} = k_{deac} \cdot [AE]; \quad (13)$$

(AE Acylenzym) bzw. nach Integration

$$\ln[AE] = \ln[AE]_0 - k_{deac} \cdot t; \quad (14).$$

Auch hier sollte sich bei Auftragung von $\log \Delta A$ gegen t eine Gerade ergeben, aus deren Richtungsfaktor die monomolekulare Geschwindigkeitskonstante k_{deac} gewonnen werden kann.

Tabelle IV - Kinetische Konstanten der Umsetzung von Cinnamoyl- und Indolacryloyl-imidazol mit Kallikreinen und anderen Serinproteinasen (5.2.16 und 5.2.17)

Enzym	Cinnamoylimidazol			Indolacryloylimidazol	
	k_{ac} [M ⁻¹ ·sec ⁻¹] pH 5,2	k_{inh} [M ⁻¹ ·sec ⁻¹] pH 5,2	$k_{deac} \cdot 10^3$ [sec ⁻¹] pH 5,2 pH 8,8	k_{ac} [M ⁻¹ ·sec ⁻¹] pH 5,2	$k_{deac} \cdot 10^3$ [sec ⁻¹] pH 8,8
neuraminidasebehandeltes Kallikrein A	173 ± 17	119 ± 9	-	350	1,2
neuraminidasebehandeltes Kallikrein B	154 ± 2	-	0,15	310	1,1
Trypsin	63,4 ^a	-	0,17 ^a	-	3,6 ^b
Chymotrypsin	12 000 ^a	-	0,17 ^a	ca. 7000 ^c	1,9 ^b
Subtilisin	-	-	-	-	ca. 3,8 ^d
Novo	-	-	-	-	ca. 22 ^d
Carlsberg	-	-	-	-	-

^a(Bender et al.1962a); ^b(Bender et al.1964); ^c(entnommen aus Abb.1 von Bernhard et al.1965a); ^d(entnommen aus Abb.6 und 7 von Johansen et al.1969)

Die Deacylierung von Cinnamoylkallikrein konnte sowohl durch Verfolgung der Extinktionsabnahme bei 300 nm (Verschwinden von Acylenzym) als auch der Extinktionszunahme bei 250 nm (Auftreten von Zimtsäure) verfolgt werden. Abbildung 4 zeigt, daß man bei Auftragung von $\log \Delta A$ nach beiden Verfahren parallele Geraden erhält, was die Übereinstimmung der gemessenen Deacylierungskonstanten beweist.

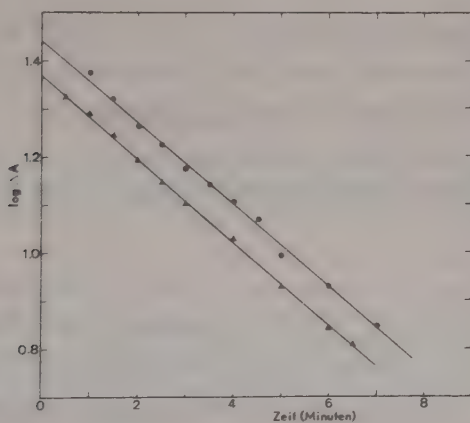


Abb.4 - Kinetik der Deacylierung bei pH 8,8 von Cinnamoylkallikrein A $\blacktriangle$ (verfolgt bei 300 nm) und Cinnamoylkallikrein B $\bullet$ (verfolgt bei 250 nm)

Analog verhielt sich Indolacryloylkallikrein, dessen Deacylierungsreaktion durch die Extinktionsabnahme bei 355 nm verfolgt wurde. Eine halblogarithmische Darstellung dieser Reaktion ist in Abbildung 5 zu sehen.

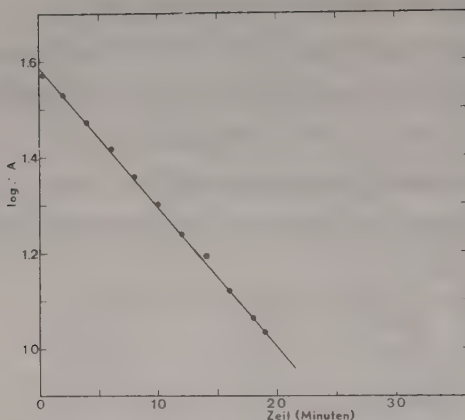


Abb.5 - Kinetik der Deacylierung bei pH 8,8 von Indolacryloylkallikrein (verfolgt bei 355 nm)

In Tabelle IV sind die Werte für k_{deac} (pH 8,8) von Kallikrein zusammen mit einigen unter vergleichbaren Bedingungen erhaltenen Werten für andere Serinhydrolasen aufgeführt.

Hemmung von Kallikrein durch Cinnamoylimidazol

Die Acylierung von Serinproteinasen durch Acylimidazole findet an der Hydroxylgruppe des Serins im aktiven Zentrum des Enzyms statt (Henderson 1970). Um zu demonstrieren, daß auch beim Kallikrein das aktive Zentrum bei der Acylierung durch Cinnamoylimidazol beteiligt ist, wurde der Verlauf der Inaktivierung des Enzyms bei der Umsetzung mit diesem Reagens untersucht.

Um eine genügende Reaktionsgeschwindigkeit zu erhalten, wurden die Versuche mit einem großen Cinnamoylimidazol-überschuß durchgeführt. Zur Verfolgung der Inaktivierung wurden in regelmäßigen Zeitabständen Proben aus dem Inkubationsansatz entnommen (5.2.17) und mit Hilfe der Spaltung von α -N-Benzoylargininäthylester (5.2.1) auf ihre verbleibende Enzymaktivität untersucht.

Die Reaktion wurde bis zu einer etwa 70 prozentigen Hemmung des Kallikreins verfolgt. Bei einem stärkeren Hemmgrad macht sich die Deacylierung des entstandenen Cinnamoylenzyms unter den Bedingungen des Aktivitätstestes bereits im Verlauf der kurzen Meßzeit von 1 Minute störend bemerkbar.

Da Cinnamoylimidazol bei diesen Untersuchungen in einem ca. 30-fachen Überschuß vorhanden war, wurde die Abnahme der Konzentration dieser Substanz durch die Reaktion mit Kallikrein vernachlässigt. Bei der verwendeten Cinnamoylimidazolkonzentration betrug die pseudomonomolekulare Geschwindigkeitskonstante bei diesem pH-Wert etwa $1,5 \cdot 10^{-3} \text{ [sec}^{-1}\text{]}$, während die Deacylierungskonstante 50 bis 100 mal kleiner ist (vgl. Tabelle IV). Die Deacylierung konnte deshalb zur Berechnung der Acylierungskonstanten vernachlässigt werden, während die Spontanhydrolyse berücksichtigt wurde.

Diese Überlegungen führen zu folgendem Ansatz

$$\frac{-d[E]}{dt} = k_{inh} \cdot [E] \cdot [CI]; (15).$$

Für die Abnahme der Cinnamoylimidazolkonzentration durch Spontanhydrolyse gilt

$$\frac{-d[CI]}{dt} = k_{hydr} \cdot [CI]; (16)$$

und integriert

$$[CI] = [CI]_0 \cdot e^{-k_{hydr} \cdot t}; (17).$$

Damit wird

$$\frac{-d[E]}{dt} = k_{inh} \cdot [E] \cdot [CI]_0 \cdot e^{-k_{hydr} \cdot t}; (18)$$

oder integriert

$$\ln [E] = \ln [E]_0 + \frac{k_{inh}}{k_{hydr}} \cdot [CI]_0 \cdot (e^{-k_{hydr} \cdot t} - 1); (19).$$

Abbildung 6 zeigt ein Diagramm von $\log E$ gegen $-(e^{-k_{hydr} \cdot t} - 1)$ wobei die Werte für k_{hydr} aus den vorhergehenden Experimenten stammen. Wie von obigem Ansatz gefordert, ergibt sich eine Gerade, aus deren Steigung $(k_{inh}/k_{hydr}) \cdot [CI]_0 \cdot \log e$ die Geschwindigkeitskonstante 2.Ordnung k_{inh} zu gewinnen ist.

Die resultierende Konstante k_{inh} ist ebenfalls in Tabelle IV angegeben. Der Wert dieser Konstante liegt in der gleichen Größenordnung wie k_{ac} für Kallikrein A, jedoch ist

k_{ac} um den Faktor 1,47 größer. Die Zahlenwerte der Konstanten sind aber mit einem relativ großen Fehler behaftet, so daß eine Identität von k_{ac} mit k_{inh} durchaus möglich erscheint.

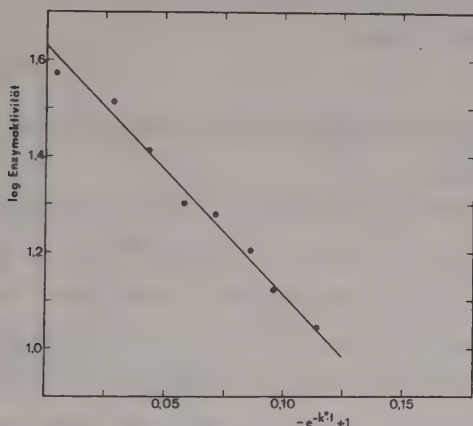


Abb. 6 - Kinetik der Hemmung bei pH 5,2 von neuraminidase-behandeltem Kallikrein A ($3,5 \cdot 10^{-7} M$) durch Cinnamoylimidazol ($1,2 \cdot 10^{-5} M$)

Eine Erklärung für die doch relativ große Abweichung der beiden Konstanten k_{ac} und k_{inh} ergibt sich, wenn man berücksichtigt, daß das Molekulargewicht von Kallikrein nach den Ergebnissen der Titration (vgl. 4.3) möglicherweise nur $3/4$ des für die Berechnung der Konstanten k_{ac} benutzten Wertes beträgt. Nach Beachtung dieser Korrektur erhält man eine gute Übereinstimmung der beiden Konstanten.

Eine Identität von k_{ac} und k_{inh} erlaubt den Schluß, daß sowohl bei den spektralphotometrischen Messungen mit Enzymüberschuß als auch bei den Hemmversuchen mit Substratüberschuß der gleiche Vorgang, die Acylierung des Enzyms im aktiven Zentrum beobachtet wird, und daß diese Reaktion eine 1:1-Stöchiometrie zeigt.

4.2.2. Spektrale Eigenschaften von Cinnamoyl- und Indolacryloylkallikrein

Nach Zugabe von Cinnamoylimidazol (Endkonzentration ca. 3 μ M) zu etwa 20 μ M Kallikreinlösungen (5.2.15) bei pH 5,2 traten spektrale Veränderungen auf, wenn gegen die gleichen Kallikreinlösungen in der Vergleichsküvette gemessen wurde. Diese spektralen Veränderungen lassen sich in Analogie zu ähnlichen Befunden mit anderen Serinhydrolasen, wie Trypsin (Bender et al.1962a), Chymotrypsin (Bender et al.1962) und Subtilisin (Oliver et al.1967), und aufgrund der vorher erwähnten Befunde durch die Bildung von Cinnamoylkallikrein erklären, bei dem der Serinrest im aktiven Zentrum acyliert ist.

Etwa 15 Minuten nach der Zugabe von Cinnamoylimidazol bleibt das Differenzspektrum im wesentlichen konstant. Innerhalb der nächsten 10 Minuten wurde im Maximum von 298 nm nur eine Abnahme um weniger als 0,001 Extinktionseinheiten beobachtet.

Ein typisches Differenzspektrum von Cinnamoylkallikrein gegen Kallikrein ist in Abbildung 7 zu sehen.

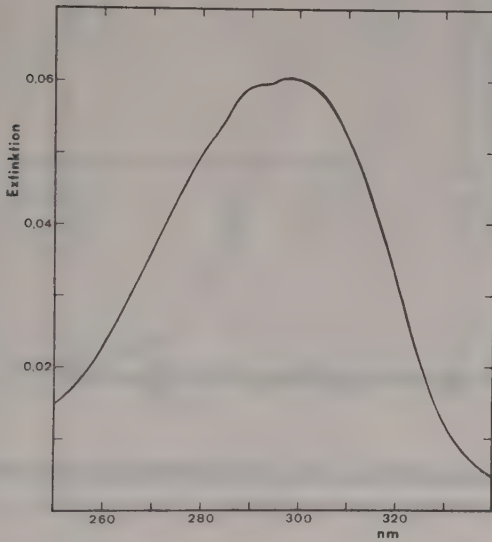


Abb.7 - Differenzspektrum von Cinnamoylkallikrein B gegen Kallikrein B (neuraminidasebehandelt) bei pH 5,2

Abbildung 8 zeigt das entsprechende Indolacryloylkallikrein-Differenzspektrum, das 25 Minuten nach Substratzusatz aufgenommen wurde und sich während der nächsten 30 Minuten nicht veränderte.

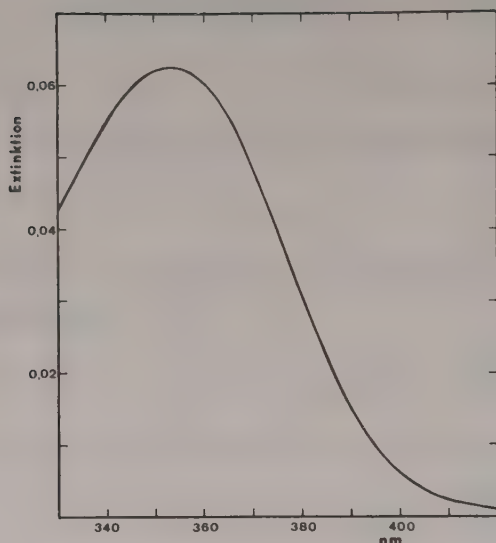


Abb.8 - Differenzspektrum von Indolacryloylkallikrein B gegen Kallikrein B (neuraminidasebehandelt) bei pH 5,2

Zwischen den mit Kallikrein A und B gewonnenen Differenzspektren konnte kein Unterschied festgestellt werden.

In Tabelle V sind die spektralen Daten der beiden Acylkallikreine aufgeführt. Als Acylenzymkonzentrationen, die zur Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten benötigt wurden, dienten die eingesetzten Acylimidazolkonzentrationen, wobei ein vollständiger Substratumsatz vorausgesetzt ist. Da sich aus den ermittelten Acylierungskonstanten be-

Tabelle V - Spektrale Daten von Cinnamoyl- und Indolacryloylgruppen im aktiven Zentrum von Kallikreinen (5.2.15) und von anderen Serinproteinasen

Enzym	Cinnamoylgruppe λ_{max} (nm) $\epsilon_{\text{max}} \cdot 10^4$ [M ⁻¹ · cm ⁻¹]	Indolacryloylgruppe λ_{max} (nm) $\epsilon_{\text{max}} \cdot 10^4$ [M ⁻¹ · cm ⁻¹]
neuraminidasebehandeltes Kallikrein A	298 1,80	353 2,24
neuraminidasebehandeltes Kallikrein B	298 1,79	353 2,17
Trypsin	296 ^{ab} 1,75 ^a 1,93 ^b	350 ^{BE} 2,15 ^a
Chymotrypsin	292 ^{cde} 1,77 ^c 1,70 ^d 1,78 ^e	359 ^f 2,00 ^f 360 ^e 1,78 ^e
Subtilisin		
Novo	289 ^E 1,89 ^E	358 ^f 2,00 ^f 349 ^E 2,53 ^E
Carlsberg	290 ^E 1,89 ^E	350 ^E 2,48 ^E

^a(Eigene Untersuchungen mit ca. $3 \cdot 10^{-5}$ M Trypsin und $3 \cdot 10^{-6}$ M Cinnamoyl- bzw. Indolacryloylimidazol analog 5.2.15.); ^b(Bender et al.1962a); ^c(Bender et al.1962); ^d(Bender et al.1964); ^e(Oliver et al.1967); ^f(Bernhard et al.1965); ^E(Johansen et al.1969)

rechnen läßt, daß nach 25 Minuten unter den gegebenen Bedingungen die Acylierung zu mindestens 99% abgelaufen ist, scheint dieses Vorgehen berechtigt zu sein. Bei der Ermittlung der Cinnamoylkallikrein-Konzentration wurde außerdem die Abnahme der Substratkonzentration durch Spontanhydrolyse bis zum Zeitpunkt der Aufnahme des Differenzspektrums berücksichtigt.

4.2.3. Vergleich des aktiven Zentrums von Kallikrein mit dem anderer Serinproteinasen

Aus Tabelle IV (s.S.38) geht hervor, daß sich die Geschwindigkeitskonstanten der Acylierung von Trypsin und Chymotrypsin durch Cinnamoyl- und Indolacryloylimidazol stark unterscheiden. Die schnellere Umsetzung dieser Substrate mit Chymotrypsin entspricht der allgemeinen Affinität dieses Enzyms zu Substraten mit aromatischen Resten, die auf die Bildung von starken hydrophoben Bindungen zurückzuführen sein dürfte.

Die Konstanten der Acylierung von Kallikrein A und B durch Cinnamoylimidazol sind dagegen derjenigen des Trypsins recht ähnlich. Die Versuche mit Trypsin wurden mit Material durchgeführt, dessen Reinheit nicht spezifiziert wurde (Bender et al.1962a). Trypsin wurde später vom gleichen Arbeitskreis auf Gehalt an aktivem Enzym untersucht. Es stellte sich dabei heraus, daß es nur ca. 50 bis 60% Aktivität aufwies (Bender et al.1966). Deshalb dürfte der in

Tabelle IV angegebene Wert um den Faktor 2 zu korrigieren sein, womit er in auffallende Nähe zur beim Kallikrein gefundenen Konstanten rückt. Dies deutet vielleicht auf einen ähnlichen Bau des aktiven Zentrums der beiden Enzyme hin.

Eine Ähnlichkeit der aktiven Zentren läßt sich schon aus der Spezifität sowohl des Kallikreins als auch des Trypsins für basische Aminosäureester als Substrate vermuten, die beim Trypsin durch eine elektrostatische Wechselwirkung der $-COO^-$ -Gruppe des Aspartylrestes 177 mit dem positiv geladenen Teil des Substrates erklärt wird (Hartley 1970).

Auch im aktiven Zentrum des Kallikreins läßt sich daher das Vorkommen einer analogen Carboxylgruppe vermuten.

Im Gegensatz zu den Acylierungskonstanten unterscheiden sich die Konstanten der Deacylierungsgeschwindigkeiten der verschiedenen Cinnamoyl- und Indolacryloylenzyme (vgl. Tabelle IV) voneinander maximal um den Faktor 5. Bender et al. (1964) fanden bei der Untersuchung der Deacylierungsgeschwindigkeiten einer Reihe von Acyl- α -chymotrypsinen und Acyltrypsinen, daß sich die Konstanten für Verbindungen der beiden Enzyme mit dem gleichen Acylrest nur geringfügig unterscheiden und schlossen daraus, daß die Wechselwirkung der einzelnen Acylgruppen mit den beiden Enzymen die gleiche ist. Diese Wechselwirkung dürfte auch beim Kallikrein - und zwar gleichermaßen beim Kallikrein A wie beim Kallikrein B - starke Ähnlichkeiten mit der der vorgenannten Enzyme haben.

Auch bei Betrachtung der Differenzspektren ergeben sich Hinweise auf die Ähnlichkeit von Kallikrein mit den anderen Serinhydrolasen. Rein qualitativ lassen sich bei der Bildung der Acylkallikreine die gleichen Verschiebungen der Maxima nach kürzeren Wellenlängen und der molaren Extinktionskoeffizienten nach kleineren Werten beobachten. Für diese Verschiebungen wurden verschiedene Erklärungsversuche gemacht (vgl.S.28). Ganz unabhängig von der tatsächlichen Ursache dieser Veränderungen läßt sich aufgrund unserer Messungen feststellen, daß der beobachtete Prozeß große Ähnlichkeit mit den bei anderen pankreatischen Serinproteinasen auftretenden Erscheinungen hat. Die ϵ_{max} -Werte von 298 nm für Cinnamoylkallikrein und von 353 nm für Indolacryloylkallikrein liegen relativ nahe bei den entsprechenden Trypsinwerten, was für eine besonders enge Verwandtschaft der für die spektralen Änderungen verantwortlichen Bereiche der beiden Enzyme spricht.

Die im Spektrum des Cinnamoylkallikreins erkennbare Feinstruktur in Form von zwei kleinen Höckern in der Nähe des Absorptionsmaximums tritt in ähnlicher Weise auch bei Cinnamoyltrypsin und Cinnamoylchymotrypsin auf. Mercouroff et al.(1963) deuten sie als Folge einer Konformationsänderung des Enzyms während der Acylierung, bei der ein oder mehrere Tryptophanreste aus einer polaren in eine hydrophobe Umgebung gelangen. Diese Ähnlichkeit könnte einen weiteren Hinweis auf die nahe Verwandtschaft von Kallikrein

einerseits und Trypsin und Chymotrypsin andererseits darstellen, zumal beim Subtilisin, dessen aktives Zentrum sich von denen der pankreatischen Serinhydrolasen deutlich unterscheidet, keine derartige Feinstruktur beobachtet wurde (Johansen et al.1969).

Bei Untersuchungen der Photoinaktivierung von Kallikrein (Werle et al.1936a) ergaben sich erste Hinweise auf die Beteiligung eines Histidinrestes am aktiven Zentrum von Kallikrein. Untersuchungen der pH-Abhängigkeit der BAEE-Spaltung (Fiedler et al.1968) und der Hemmung durch DFP (Fiedler et al.1969) ergaben die Beteiligung einer dissozierten Gruppe vom pK_a ca.6,9, was in Analogie zu Befunden bei anderen Serinhydrolasen wohl als Ausdruck der katalytischen Funktion eines Histidinrestes im aktiven Zentrum zu deuten ist.

Die Tatsache, daß am aktiven Zentrum von Kallikrein ein Serinrest beteiligt ist (Fiedler et al.1969) wurde schon mehrmals erwähnt. Im Abschnitt 3.2. dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß auch die Primärsequenz am aktiven Zentrum von Kallikrein große Ähnlichkeiten mit der von Trypsin aufweist.

Nach allen vorliegenden Befunden stellt das Organkallikrein des Schweins ein weiteres Glied der Familie der Serinhydrolasen des Pankreas dar.

4.3. Umsetzung von Kallikrein mit p-Nitrophenyl-p'-guanidinobenzoat

4.3.1. Biphasischer Verlauf der p-Nitrophenol-Freisetzung

Es wurden zunächst eine Reihe verschiedener p-Nitrophenyl-ester auf ihre Substrateigenschaften gegenüber Kallikrein geprüft, wobei jeweils die Freisetzung von p-Nitrophenol bei pH 6,5 spektralphotometrisch verfolgt wurde (analog 5.2.20). Die Kallikreinkonzentration war bei diesen Versuchen so hoch, daß schon ein stöchiometrischer Umsatz des Substrates zu einer beträchtlichen Extinktionszunahme führen mußte.

0,1 mM p-Nitrophenylacetat, Diäthyl-p-nitrophenylphosphat und bis-p-Nitrophenylphosphat-Na ließen keinerlei Reaktionsfähigkeit gegenüber Kallikrein erkennen. CBZ-L-Lysin-p-nitrophenylester wurde bei pH 6,5 durch Kallikrein sehr rasch hydrolysiert. Bei pH 3,0, einem Wert wie er bei der Titration von Trypsin verwendet wurde (Bender et al. 1966), läßt sich bei der Freisetzung von p-Nitrophenol (verfolgt bei 340 nm) keine klare Trennung von Acylierungs- und Deacylierungsphase durchführen.

Dagegen erwies sich p-Nitrophenyl-p'-guanidinobenzoat (NPGB) als ein für die Untersuchung der Umsetzung mit Kallikrein geeignetes Substrat. Für das nähere Studium dieser Reaktion wurde außer pH 6,5 auch der pH-Wert 8,3 gewählt, bei dem analoge Untersuchungen am Trypsin und an anderen Serinpro-

teinasen durchgeführt worden waren (Chase et al.1969).

Nach Zusatz einer Kallikreinlösung zu einem großen NPGB-Überschuß erhält man bei Verfolgung der Reaktion am Cary-Spektralphotometer bei 402 nm, wo das p-Nitrophenolation ein Extinktionsmaximum zeigt, einen Reaktionsverlauf, wie er in den Abbildungen 9 und 10 in typischen Beispielen für die beiden pH-Werte wiedergegeben ist.

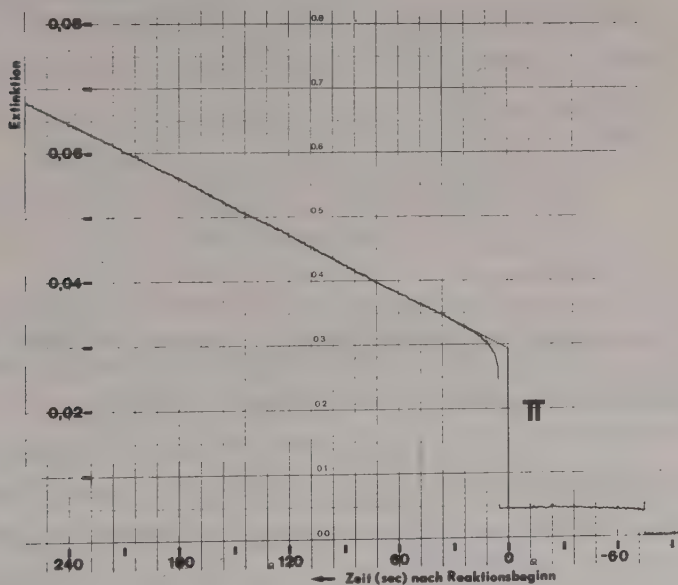


Abb.9 - Umsetzung von neuraminidasebehandeltem Kallikrein A (4,4 μ M) mit NPGB (100 μ M) bei pH 6,5 (Start der Reaktion mit Enzym). Die punktierte Linie zeigt die Rückextrapolation auf den Zeitpunkt 0. (vgl. 5,2.20).

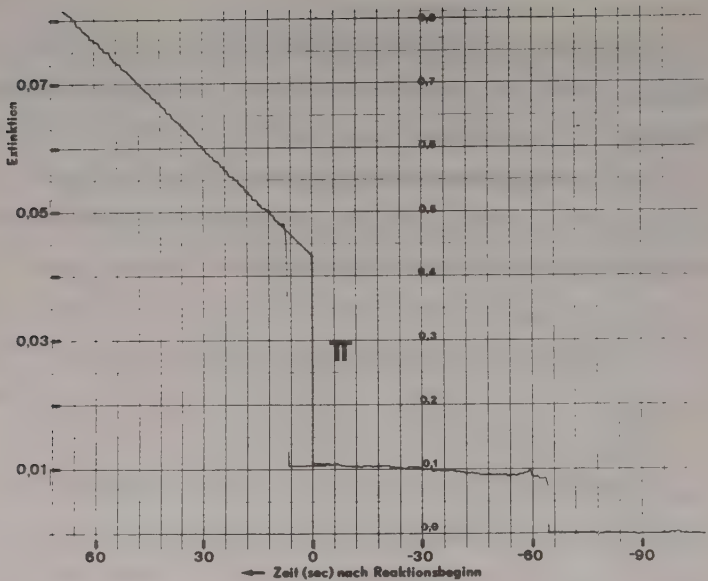
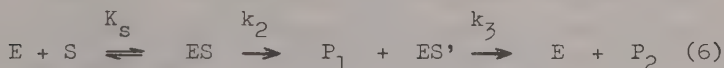


Abb.10 - Umsetzung von neuraminidasebehandeltem Kallikrein A (1,78 μM) mit NPGb (100 μM) bei pH 8,3 (Start der Reaktion mit Enzym). Die punktierte Linie zeigt die Rückextrapolation auf den Zeitpunkt 0. (vgl. 5.2.20).

Es zeigt sich jeweils eine anfängliche sehr rasche Freisetzung von p-Nitrophenol, die bei pH 8,3 so rasch ist, daß sie sich mit der gewählten Arbeitstechnik nicht mehr erfassen läßt, während bei pH 6,5 noch ein Teil der 1.Reaktionsphase registriert werden kann (Diese Phase wird nicht durch einen Extinktionssprung beim Zusatz der Kallikreinlösung zu der nur sehr schwach absorbierenden Substratlösung vorge-täuscht!). Anschließend an diese rasche Reaktionsphase er-

folgt dann eine weitere, wesentlich langsamere Freisetzung von p-Nitrophenol mit innerhalb der Meßzeit konstanter Geschwindigkeit, die bei pH 6,5 wesentlich langsamer als bei pH 8,3 verläuft.

Die in der ersten, raschen Phase freigesetzte Menge p-Nitrophenol entspricht etwa der vorhandenen Menge Kallikrein, wie weiter unten ausführlich gezeigt wird. Dieser biphasische Verlauf der Umsetzung des Enzyms mit NPGB ist eine starke Stütze für das Vorliegen eines im Reaktionsschema (6) formulierten Acylenzym-Mechanismus. Dieses Reaktionsschema sei hier der besseren Übersicht wegen noch einmal aufgeführt (vgl. auch S.26):



Danach erklären sich die experimentellen Beobachtungen wie folgt: Beim Mischen von Enzym und Substrat erfolgt zunächst (anschließend an die Bildung eines bei den vorliegenden Experimenten nicht erfaßbaren Michaelis-Menten-Komplexes ES) eine von der Geschwindigkeitskonstante k_2 bestimmte Reaktion, bei der das Enzym durch den p-Guanidinobenzoesäure-rest des Substrates acyliert wird (Acylenzym ES'), wobei stöchiometrische Mengen p-Nitrophenol frei werden (P_1). Die zweite, stationäre Phase der Nitrophenolfreisetzung resultiert aus der durch k_3 bestimmten Deacylierung des Acylenzyms ES' , wobei das Enzym E regeneriert wird und nun wieder-

um mit neuem NPGB unter Freisetzung von p-Nitrophenol reagieren kann.

Neben den Reaktionen mit DFP und Cinnamoyl- und Indolacryloylimidazol sprechen demnach auch die Ergebnisse der Versuche mit NPGB dafür, daß die von Kallikrein katalysierten Hydrolysen über ein Acylenzym-Zwischenprodukt verlaufen.

Infolge der deutlichen Trennung von Acylierungs- und Deacylierungsphase erscheint NPGB als geeignetes Substrat für die Titration der aktiven Zentren von Kallikrein.

4.3.2. Titrationstheorie

Zur quantitativen Auswertung der Versuche mit NPGB seien zunächst die aus dem Reaktionsschema (6) folgenden kinetischen Gleichungen angeführt (Gutfreund et al.1956; Bender et al.1966; Bender et al.1967).

Für die Geschwindigkeit der Bildung von p-Nitrophenol folgt für den hier vorliegenden Fall $[S]_0 \gg [E]_0$ (22- bis 80-facher Überschuß) bzw. für die gleichbedeutende Annahme

$$[S]_t = [S]_0 = \text{const.} = [S]$$

$$\frac{d[P_1]}{dt} = k_2 \cdot [ES] = \frac{k_2 \cdot [E]_0 - k_2 \cdot \frac{a}{b} \cdot (1 - e^{-bt})}{1 + \frac{K_s}{[S]}}; \quad (20)$$

$$\text{mit } a = \frac{k_2 \cdot [E]_0}{1 + K_S/[S]} ; \text{ und } b = k_3 + \frac{k_2}{1 + K_S/[S]} ;$$

Durch Integration ergibt sich die Zeitabhängigkeit der Konzentration von enzymatisch freigesetztem p-Nitrophenol (P_1) zu

$$[P_1] = \frac{k_2 \cdot [E]_0 - k_2 \cdot \frac{a}{b}}{1 + K_S/[S]} \cdot t + \frac{k_2 \cdot a}{b^2(1 + K_S/[S])} (1 - e^{-bt}); \quad (21)$$

Für große Werte von t geht e^{-bt} nach Null. Gleichung (21) erhält dann die Form einer Geraden

$$[P_1] = \pi + A \cdot t; \quad (22)$$

$$\text{mit } \pi = \frac{k_2 \cdot a}{b^2(1 + K_S/[S])} = \frac{[k_2/(k_2 + k_3)]^2}{(1 + K_m/[S])^2} \cdot [E]_0 ; \quad (23)$$

$$\text{und } A = \frac{k_2 \cdot [E]_0 - k_2 \cdot \frac{a}{b}}{1 + K_S/[S]} = \frac{k_{cat} \cdot [E]_0}{1 + K_m/[S]} = v ; \quad (24)$$

$$\text{wobei } K_m = \frac{K_S \cdot k_3}{k_2 + k_3}; \text{ und } k_{cat} = \frac{k_2 \cdot k_3}{k_2 + k_3};$$

Die Gleichung (23) eröffnet die Möglichkeit, aus dem aus der stationären Reaktionsphase auf die Zeit $t = 0$ rückextrapolierten Achsenabschnitt π (vgl. Abbildungen 9 und 10), der in der angelsächsischen Literatur als "burst" bezeichnet wird, bei Kenntnis von k_2 , k_3 , K_m und $[S]$ die Konzentration $[E]_0$ des enzymatisch aktiven Enzyms, d.h. die Konzentration der an der Hydrolyse von NPGB beteiligten aktiven Zentren des Enzyms zu ermitteln.

K_m kann aus Gleichung (24) gewonnen werden, die die normale Michaelis-Menten-Gleichung für die stationäre Phase darstellt, z.B. graphisch in der nach Lineweaver-Burk linearisierten Form

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{k_{cat} \cdot [E]_0} + \frac{K_m}{k_{cat} \cdot [E]_0} \cdot \frac{1}{[S]}; \quad (25)$$

Hierbei wird auch $k_{cat} = \frac{k_2 \cdot k_3}{k_2 + k_3}$; erhalten.

Aus der nichtstationären Anfangsphase läßt sich der Wert von k_2 wie folgt ermitteln:

$$[P_1] - A \cdot t - \pi = -\pi e^{-bt}; \quad (26)$$

Δ

Die linke, mit Δ bezeichnete Seite der Gleichung (26) stellt einfach die aus der Differenz zwischen der aus der stationären Phase rückextrapolierten Geraden und der Verlaufskurve von $[P_1]$ dar. Die Auftragung von $\ln \Delta$ gegen t liefert als Steigung den Wert von

$$b = k_3 + \frac{k_2}{1 + K_s/[S]}; \quad (27)$$

Für den Fall $k_2 \gg k_3$ ergibt sich

$$\frac{1}{b} = \frac{1}{k_2} + \frac{K_s}{k_2} \cdot \frac{1}{[S]}; \quad (28)$$

Der Achsenabschnitt liefert also k_2 und die Steigung K_m .
Bei Kenntnis von k_{cat} läßt sich schließlich

$$k_3 = \frac{k_{cat} \cdot k_2}{k_2 - k_{cat}}; \quad (29)$$

gewinnen, wobei für $k_2 \gg k_3$ $k_{cat} = k_3$ wird.

Zur Bestimmung von $[E]_0$ bringt man Gleichung (23) zweckmäßig in die Form

$$\frac{1}{\sqrt{\pi}} = \frac{k_2 + k_3}{k_2} \cdot \frac{1}{[E]_0} + \frac{K_m(k_2 + k_3)}{k_2 \cdot [E]_0} \cdot \frac{1}{[S]}; \quad (30)$$

Die Auftragung von $1/\sqrt{\pi}$ gegen S liefert also $\frac{k_2 + k_3}{k_2 \sqrt{[E]_0}}$,

woraus sich $[E]_0$ berechnen läßt, sowie eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung von K_m .

Für den Fall $k_2 \gg k_3$ und $K_m \ll S$ vereinfacht sich die Gleichung (23) zu

$$\pi = [E]_0; \quad (31)$$

sodaß aus dem "burst" sofort die Enzymkonzentration zu entnehmen ist.

4.3.3. Titration des aktiven Zentrums von Kallikrein

Bei der Titration von Trypsin mit NPGB ist die Deacylierungsgeschwindigkeit auch bei pH 8,3 äußerst gering (Chase et al.1967). Beim Kallikrein dagegen ist sie bereits bei pH 6,5 sehr merklich. Die dadurch bedingte Freisetzung von p-Nitrophenol geht jedoch streng proportional mit der Zeit, sodaß eine Rückextrapolation auf den Zeitpunkt Null sowohl bei pH 6,5 als auch bei pH 8,3 leicht möglich ist (vgl. Abbildungen 9 und 10).

Demnach läßt sich die Titration von Kallikrein mit NPGB bei beiden pH-Werten durchführen. Wir entschieden uns für pH 8,3, da dieser Wert genügend weit vom pK_a -Wert des p-Nitrophenols von 7,04 (Kézdy et al.1962) bzw. 7,15 (Handbook 1962) entfernt ist, sodaß kleine pH-Schwankungen den Extinktionskoeffizienten wenig beeinflussen.

Nach Untersuchungen von Chase et al.(1967) ist bei diesem pH-Wert Veronal der geeignetste Puffer, da die Spontanhydrolyse des Nitrophenolesters darin am langsamsten ist. Aus unseren Messungen ergab sich bei den gewählten Bedingungen (5.2.20) ein k_{hydr} von etwa $0,15 \cdot 10^{-4} [\text{sec}^{-1}]$, was mit dem von Chase et al.(1967) angegebenen Wert von $0,1 \cdot 10^{-4}$ übereinstimmt. Wie aus Abbildung 10 zu entnehmen ist, ist die Spontanhydrolyse jedoch so langsam, daß die zur Ermittlung von k_3 anzubringenden Korrekturen nur gering sind.

Der Extinktionskoeffizient des p-Nitrophenols wurde bei pH 8,3 (0,1 M Veronal; 1 mM EDTA am Cary-Spektralphotometer (5.2.18) bei Nitrophenolatkonzentrationen bestimmt, wie sie bei den Titrationsexperimenten vorkommen. Es ergab sich im Maximum von 402 nm aus 8 Bestimmungen ein Wert von $17\,230 \pm 310 \text{ (M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}\text{)}$. Chase et al.(1967) geben beim gleichen pH-Wert bei 410 nm, wo das p-Nitrophenolation noch etwa 95% seiner maximalen Extinktion zeigt, $16\,495 \pm 145$ an, was mit dem hier ermittelten Wert gut übereinstimmt. Nach Kézdy et al.(1962) ist ϵ_{max} des Nitrophenolations in 0,01 N NaOH $18\,320$, woraus sich unter Berücksichtigung des von diesen Autoren angegebenen pK_a von 7,04 für pH 8,3 ein Wert von $17\,300$ errechnen läßt, was in guter Übereinstimmung mit dem hier gefundenen Wert steht. Mit dem im Handbook (1962) angegebenen pK_a von 7,15 würde sich ein Extinktionskoeffizient von $17\,000$ berechnen. Durch Zusatz von 0,8% Acetonitril, entsprechend den Verhältnissen bei den Titrationsexperimenten (5.2.20) wurde der Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol nicht beeinflusst, ebensowenig durch die Gegenwart von äquivalenten Mengen Kallikrein.

Die Titrationen wurden bei Kallikreinkonzentrationen von ca. 1,2 bis 1,8 μM mit NPGB-Konzentrationen von 40 bis 100 μM durchgeführt. Damit ist die Bedingung $[\text{S}] \gg [\text{E}]_0$ gut erfüllt (vgl. S.56). Für die Mehrzahl der Titrationsexperimente wurde Enzym zur Substratlösung zugesetzt. Bei jeder Versuchsreihe wurden aber auch einige Experimente mit

umgekehrter Reihenfolge des Reagentienzusatzes durchgeführt. Beide Arbeitsweisen führten zu gleichen Ergebnissen.

Innerhalb der Fehlergrenzen zeigte die Geschwindigkeit der stationären Reaktionsphase v keine Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Daraus folgt, daß $K_m \ll [S]$ sein muß.

Zur Ermittlung von k_2 mußte eine "stopped flow"-Methode (5.2.19) benutzt werden, da sich die nichtstationäre Anfangsphase der Reaktion am Cary 15 nicht mehr verfolgen ließ. Ein typisches experimentelles Beispiel ist in Abbildung 11 gezeigt. Für $[S] = 50 \mu M$ ergab sich ein b von $5,5 \pm 0,5 \text{ [sec}^{-1}]$ für neuraminidasebehandeltes Kallikrein B. Dieser Wert gibt eine Untergrenze für k_2 , das nach Gleichung (28) stets größer als b sein muß.

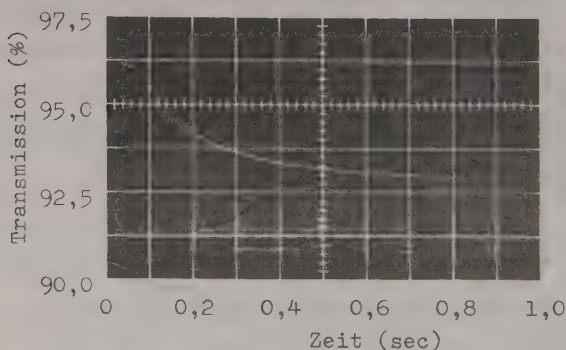


Abb.11 - Umsetzung von neuraminidasebehandeltem Kallikrein B ($1,09 \mu M$) mit NPGB ($50 \mu M$) bei pH 8,3, verfolgt am Gibson-Durrum "stopped flow"-Spektralphotometer (5.2.19). Wiederholte Rückführung des Elektronenstrahls zur Verfolgung der stationären Reaktionsphase.

Zur Bestimmung von k_3 aus k_{cat} (stationäre Reaktionsphase) war zunächst zu sichern, daß die Hydrolyse von NPGB nur vom aktiven Zentrum des Kallikreins und nicht unspezifisch durch andere Teile des Moleküls katalysiert wird. Eine solche unspezifische Katalyse war vorher beim Trypsin beobachtet worden (Chase et al. 1967). Ein kontrolliert mit DFP behandeltes Kallikreinpräparat, das gegenüber BAEE nur noch 52% seiner ursprünglichen enzymatischen Aktivität aufwies, zeigte in der stationären Reaktionsphase mit NPGB in guter Übereinstimmung damit nur noch 53% der ursprünglichen Reaktionsgeschwindigkeit. Damit spielt eine unspezifische Hydrolyse von NPGB beim Kallikrein - wie auch etwa beim Thrombin (Chase et al. 1969) - keine Rolle.

Aus der Hydrolysegeschwindigkeit in der stationären Reaktionsphase läßt sich demnach nach Abzug der geringen Sontanhydrolyse des Substrates (vgl. S. 60) k_{cat} erhalten (Gleichung (25)). Da v von $[S]$ unabhängig ist, gilt vereinfacht $v = k_{cat} \cdot [E]$. Unter der Voraussetzung $k_2 \gg k_3$ wird $k_{cat} = k_3$. Der Wert von k_3 wurde für Kallikrein A und B gleichermaßen zu $(2,33 \pm 0,08) \cdot 10^{-2} [\text{sec}^{-1}]$ bestimmt. Da demnach $k_3 \ll b$ erfüllt ist, muß erst recht $k_3 \ll k_2$ gelten.

Aus den experimentellen Ergebnissen $k_m \ll [S]$ und $k_3 \ll k_2$ folgt nach S. 59, daß die Konzentration des Kallikreins direkt aus dem burst π ermittelt werden kann. Innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches erwies sich denn auch

der beobachtete burst erwartungsgemäß als unabhängig von der Substratkonzentration.

Die Ergebnisse der Titration verschiedener Kallikreinpräparate sind in Tabelle VI zusammengefaßt. Die durch Titration ermittelten Kallikreinkonzentrationen liegen allgemein höher als die durch Aminosäureanalysen bestimmten (vgl. Tabelle VI, vorletzte Spalte). Die spezifische Aktivität der für die Titration verwendeten Kallikreinpräparate schwankte, gemessen mit BAEE als Substrat von 218 bis 287 U_{AT}/mg . Aminosäureanalysen zeigten jedoch keine Unterschiede zwischen den einzelnen Präparaten. Nimmt man an, daß die höchste bestimmte spezifische Aktivität von 287 U_{AT}/mg dem reinen Kallikrein zukommt und die geringeren spezifischen Aktivitäten der anderen Präparate durch einen Gehalt an denaturiertem, enzymatisch inaktivem Kallikrein bedingt sind, so lassen sich die in der letzten Spalte der Tabelle VI angegebenen Quotienten aus den durch Titration ermittelten Konzentrationen und den gegenüber BAEE enzymatisch aktiven Kallikreinkonzentrationen berechnen. Die einzelnen Quotienten zeigen nur geringe Schwankungen um den Mittelwert $1,36 \pm 0,04$. Daraus dürfte der Schluß zu ziehen sein, daß die Titration mit NPGB nur das gegenüber BAEE enzymatisch aktive Kallikrein erfaßt.

Das Ergebnis, daß die Titration der aktiven Zentren von Kallikrein 1,36 mal so hohe Werte liefert wie aus der eingesetzten Menge an BAEE-aktivem Enzym zu erwarten war, ist

Tabelle VI - Titration von Kallikrein mit NPGb (vgl. 5.2.20)

Kallikrein- präparat ^a	Charge	spez. Aktiv. $U_{A_{11}}/mg$	$[E]_{AS}$ [μM]	$\pi \pm \sigma (\pi)$ $A_{402 \text{ nm}}$ $\times 10^3$	n	$[E]_{\eta}$ [μM]	$\frac{[E]_{\eta}}{[E]_{AS}}$	$\frac{[E]_{\text{Titr.}}}{[E]_{e.A.}}$
Kallikrein B	H 380 ₁	218,0	1,55	$26,6 \pm 0,6$	9	1,54	1,00	1,31
Kallikrein A	H 380 ₂	223,5	1,78	$32,2 \pm 1,2$	7	1,87	1,05	1,35
Kallikrein B	H 376	245,0	1,67	$32,2 \pm 0,4$	6	1,87	1,13	1,39
Kallikrein B	H 400 (8 + 9)	282,5	1,63	$37,1 \pm 0,6$	5	2,15	1,32	1,34
Kallikrein B	H 400 (11+12)	287,2	1,20	$28,7 \pm 1,1$	6	1,66	1,39	1,39

^a Alle Präparate neuraminidasebehandelt; n Anzahl der Messungen; $[E]_{AS}$ aus dem Aminosäuregehalt der Kallikrein-Stammlösungen ermittelte Enzyzkonzentration;

$[E]_{\eta}$ durch Titration ermittelte Konzentration der aktiven Zentren; $[E]_{e.A.}$ Konzentration des enzymatisch aktiven Enzyms (berechnet aus $[E]_{AS}$ und der spezifischen Aktivität.

sehr überraschend. Die gute Übereinstimmung der Resultate trotz der Unterschiede in den Versuchsbedingungen (verschiedene Kallikreinpräparate, unterschiedliche Kallikreinkonzentrationen und Konzentrationsverhältnisse von Substrat zu Enzym) sowie die geringen Standardfehler der spezifischen Aktivitäten ($\pm 3\%$) und der Titrationsergebnisse zeigen, daß experimentelle Fehler nicht zur Erklärung herangezogen werden können.

Die Ursache für die Nichtübereinstimmung könnte einmal bei der Ermittlung der Kallikreinkonzentrationen durch Titration und andererseits bei der Konzentrationsbestimmung durch Aminosäureanalyse oder schließlich bei beiden zu suchen sein.

Bei der Titration wäre eine mögliche Fehlerquelle die Verwendung eines nicht zutreffenden Extinktionskoeffizienten für p-Nitrophenol. Der in der vorliegenden Arbeit benützte Wert stimmt aber mit den Literaturangaben weitgehend überein (vgl. S.61). Da die Bestimmung dieses Extinktionskoeffizienten unter gleichen Bedingungen (gleicher Puffer, vergleichbare Konzentrationen und damit Extinktionen) am gleichen Spektralphotometer durchgeführt wurde und da gezeigt wurde, daß die Extinktion von p-Nitrophenol durch die Anwesenheit von Acetonitril und Kallikrein nicht beeinflusst wird, scheidet diese Erklärungsmöglichkeit aus.

Die Möglichkeit, daß das p-Guanidinobenzoyl-Enzym eine

Absorption bei 402 nm besitzt oder daß sich bei der Reaktion einer Verunreinigung des NPGB-Präparates (das bei dieser Wellenlänge praktisch keine Eigenabsorption zeigt) mit Kallikrein eine gefärbte Verbindung bildet, erscheint äußerst unwahrscheinlich. Eher könnte man daran denken, daß außer p-Nitrophenol noch andere Nitrophenylverbindungen mit höheren Extinktionskoeffizienten aus dem Substrat freigesetzt werden. Bei vollständiger Hydrolyse des Substrates entweder durch Kallikrein oder durch NaOH werden jedoch nur etwa 90% der für das p-Nitrophenolation erwarteten Extinktion erreicht, was einen nennenswerten Gehalt an einer bei 402 nm stärker als p-Nitrophenol absorbierenden Komponente unwahrscheinlich macht. Immerhin sind derartige Verunreinigungen nicht auszuschließen. Dieses Problem ist in unserem Arbeitskreis zur Zeit noch in Bearbeitung.

Gegen die Interpretation des Nachweises von 1,36 aktiven Zentren pro Kallikreinmolekül als das Vorliegen einer Mischung von Enzymmolekülen mit 1 bzw. 2 aktiven Zentren sprechen folgende Tatsachen: Kallikreinpräparate unterschiedlichen Reinheitsgrades müßten diese beiden Formen in gleichen Verhältnissen enthalten. Außerdem ergab die Verfolgung der Acylierung von Kallikrein durch DFP, Cinnamoyl-imidazol und NPGB keinerlei Hinweise auf das Vorliegen verschiedener aktiver Zentren mit unterschiedlichen katalytischen Eigenschaften und ebensowenig die ausgedehnten kine-

tischen Untersuchungen mit verschiedenen Estersubstraten (Fiedler, F., Leysath, G., und Werle, E., Manuskript in Vorbereitung).

Am naheliegendsten erscheint noch die Möglichkeit, daß der benutzte Wert von 33 600 für das Molekulargewicht von Kallikrein zu hoch ist. Dieser Wert basiert auf einem durch Gel-filtration gefundenen Molekulargewicht von etwa 33 500 (Fritz et al.1965). Die Aminosäureanalyse ergab für ein Molekulargewicht dieser Größenordnung das Vorkommen von 4 Argininresten pro Kallikreinmolekül, worauf sich aus der Bausteinanalyse der hier verwendete genauere Wert für das Molekulargewicht errechnet (Fritz et al.1967). Nimmt man an, daß im Kallikreinmolekül nur 3 Argininreste enthalten sind, berechnet sich ein Molekulargewicht von 25 200. Mit einem solchen Molekulargewicht würden die Titrationsergebnisse genau eine 1:1-Stöchiometrie ergeben. Zieht man einen Zuckergehalt von etwa 7% (Fritz et al.1967) ab, dann bliebe als Molekulargewicht für den Proteinteil des Kallikreins der Wert von 23 400. Für Rindertrypsin (Hofmann et al.1964) wurde ein Molekulargewicht von 23 300 gefunden für Schweinetrypsin (Travis et al.1965) 23 400 und für Chymotrypsin A des Rindes (Eck et al.1966) 25 300. Diese Werte würden gut mit dem hier abgeleiteten Wert für das Molekulargewicht des Proteinanteils von Kallikrein übereinstimmen.

Es ist bekannt, daß Molekulargewichtsbestimmungen durch Gel-

filtration bei Glykoproteinen zu zu hohen Werten führen können (Andrews 1970). In der Ultrazentrifuge wurde für Kallikrein ein Wert von 23 000 bis 24 000 (Habermann 1962) ermittelt. Moriya gab zunächst einen Wert von 33 000 (Moriya 1959) an, während er neuerdings (Moriya et al. 1969) auf 25 200 kommt. Mit der gleichen Technik erhielt Scholtan (zitiert in Fritz et al. 1967) einen Wert von 29 000.

Zur Erklärung der unterschiedlichen Resultate von Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge wurde vorgeschlagen (Habermann 1962), daß verschiedene Abbaustufen des Kallikreins mit unterschiedlichen Molekulargewichten vorlagen. Versuche mit Präkallikrein (Fiedler et al. 1970) zeigten auch das Auftreten unterschiedlicher Kallikreinformen bei unterschiedlichen Aktivierungsbedingungen. Da aber alle in der Ultrazentrifuge untersuchten Präparate aus Pankreasautolysaten gewonnen worden waren, erscheint diese Erklärung wenig wahrscheinlich.

Alles in allem sind die mittels der Ultrazentrifuge erhaltenen Resultate ebenso gut mit einem Wert von etwa 25 000 für das Molekulargewicht von Kallikrein vereinbar. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen eine Überprüfung des Molekulargewichtes von Kallikrein mit unabhängigen Methoden dringend nahe.

5. Material und Methoden

5.1. Material

Kallikreine: Schweinepankreas-kallikrein wurde nach Fritz et al.(1967) isoliert und nach Fiedler et al.(1967) in die Kallikreine A und B aufgespalten. Durch Behandlung mit Neuraminidase wurde elektrophoretisch nahezu einheitliches Kallikrein A bzw. B erhalten (Fritz et al.1967; Fiedler et al. 1970). Schweineharnkallikrein und eines der Submandibularis-kallikrein-Präparate wurde nach Fritz et al.(1969), die andere nach Werle et al.(1963) isoliert.

Trypsin: Rindertrypsin, Serva, Heidelberg

Alkohol-Dehydrogenase: aus Hefe, C.F.Böhringer u.Söhne, Mannheim

DFP: Geschenk der Farbwerke Bayer, Werk Elberfeld

DFP-32: Radiochemical Centre, Amersham

Cinnamoylimidazol: Serva, Heidelberg

Indolacryloylimidazol: Geschenk von Dr.R.W.A.Oliver

NPGb·HCl: Cyclo Chemical Co., Los Angeles

BAEE·HCl: E.Merck, Darmstadt

Acetonitril: "Uvasol", E.Merck, Darmstadt

Alle weiteren Reagentien waren jeweils vom höchsten im Handel erhältlichen Reinheitsgrad: p.a. bzw. puriss.

5.2. Methoden

5.1. Bestimmung der Kallikreinaktivität ("direkte Methode")

Das von Trautschold et al.(1961) angegebene Verfahren zur Bestimmung von Kallikrein, das auf der esterolytischen Spaltung von BAEE beruht, wurde geringfügig modifiziert.

Die Hydrolyse von BAEE wurde bei 253 nm, wo das Differenzspektrum von α -N-Benzoyl-L-arginin gegen den Ester sein Maximum aufweist, verfolgt. Zur Messung wurde ein Leitz-Unicam SP 800 Spektralphotometer mit Skalenspreizung, die so eingestellt war, daß sich auf einem angeschlossenen Servogor-Zusatzschreiber für 0,4 Extinktionseinheiten der volle Ausschlag ergab, und auf 25°C thermostatisierten Küvettenhaltern verwendet.

Die Meßküvetten mit 1 cm Schichtdicke enthielten in 3,0 ml Gesamtvolumen 2,3 bis 2,45 ml Tris-HCl-Puffer pH 8,0 (0,1 M Tris und 1 mM EDTA), 0,50 ml einer BAEE-Lösung (Endkonzentration 0,5 mM) und 0,05 bis 0,20 ml Kallikreinlösung (mit ca. 0,1 μ g aktivem Kallikrein) mit maximal 1 μ l Acetonitril. In der Vergleichsküvette befanden sich 2,5 ml des Puffers und 0,5 ml der BAEE-Lösung.

Die Kallikreinmengen waren wesentlich höher als sie üblicherweise bei dieser Bestimmung eingesetzt werden, um in möglichst kurzer Zeit eine genügend große Extinktionsänderung zu erhalten (vgl. 5.2.17). Die Reaktion wurde 1 Minute lang

verfolgt. Dabei betrug die Extinktionszunahme ca. 0,04 Extinktionseinheiten, was einem Substratumsatz von ca. 0,1 μMol entspricht.

In Vorversuchen wurde festgestellt, daß sich die Extinktionsänderung bei diesem Test bei Zusatz von 0,05 bis 0,2 μg Kallikrein proportional der zugesetzten Enzymmenge verhielt.

5.2.2. Bestimmung der Kallikreinaktivität mit Alkohol-Dehydrogenase als Hilfsenzym (Trautschold et al.1961)

In einer Küvette von 1 cm Schichtdicke wurden bei 25°C inkubiert: 2,28 ml Puffer (0,075 M $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$; 0,075 M Semicarbazidhydrochlorid; 0,022 M Glycin; mit 2 N NaOH auf pH 8,7 eingestellt), 0,5 ml 3 mM BAEE·HCl (Endkonzentration 0,5 mM), 0,1 ml 0,03 M Nicotinamid-adenin-dinucleotid (Endkonzentration 1 mM), 20 μl Alkohol-Dehydrogenase (C.F.Böhringer u. Söhne, Mannheim; 120 Einheiten; 0,6 mg) und 0,1 ml Kallikreinlösung. Die Absorptionszunahme wurde über 10 Minuten hinweg bei 366 nm am Spektralphotometer Eppendorf verfolgt und mit dem Wert für die Spontanhydrolyse von BAEE korrigiert. Da bei diesem Verfahren Proportionalität zwischen der vorhandenen Enzymmenge und der Extinktionszunahme nur in einem sehr engen Bereich herrscht (Fritz et al.1967), wurde die jeweilige Enzymmenge so gewählt, daß die Extinktionszunahme pro 10 Minuten zwischen 0,09 und 0,13 Extinktionseinheiten lag. Eine Extinktionszunahme von 0,110 in 10 Minuten entspricht 0,1 U Kallikrein.

5.2.3. Bestimmung der Kallikreinaktivität am Autotitrator

Die Geschwindigkeit der Hydrolyse von BAEE durch Kallikrein wurde durch Titration mit 0,1 N NaOH bei pH 8,0 in einem Autotitrator TTT 1c mit Autobürette ABU 1b (0,25 ml) der Firma Radiometer (Kopenhagen) bestimmt. Das mit Stickstoff durchspülte und auf 25°C thermostatisierte Reaktionsgefäß enthielt 20 ml 10 mM BAEE-Lösung (0,1 M NaCl, 0,1 mM Thio-glykolsäure). Die Reaktion wurde mit Kallikreinlösung gestartet. Die Kallikreinmenge wurde so gewählt, daß der Laugenverbrauch pro Minute etwa 1 bis 2 μ Mol betrug. Eine Kallikreineinheit U_{AT} ist diejenige Kallikreinmenge, die unter den angegebenen Bedingungen 1 μ Mol BAEE pro Minute umsetzt.

5.2.4. Bestimmung der Reinheit des DFP

Die Reinheit des verwendeten DFP-Präparates wurde durch Titration vor und nach Hydrolyse mit 0,01 N NaOH ähnlich dem Verfahren von Moon et al. (1965) kontrolliert. Zur Hydrolyse wurden ca. 15 mg DFP mit 40 ml 0,01 N NaOH versetzt und der Ansatz wurde 8 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Hierauf wurde mit 0,1 N HCl unter Stickstoffatmosphäre unter Verwendung einer Glaselektrode (Pusl) zurücktitriert. Eine Hydrolysedauer von 8 Stunden war ausreichend, da in Kontrollversuchen festgestellt wurde, daß auch bei längerer Dauer kein weiterer Laugenverbrauch mehr eintritt. Zur Bestimmung des Gehalts an freier Säure wurden ca. 30 mg des DFP-Präparates in 50 ml CO₂-freiem Wasser gelöst und mit 0,01 N NaOH auf pH 7,0 titriert. Für die Berechnung wurde angenommen,

daß 1 Molekül DFP 2 Protonen freisetzt (Saunders et al.1948). Bei Titration bis zum Endpunkt bei pH 7,0 (Moon et al.1965), bzw. pH 9,0 (Saunders et al.1948) ergaben sich keine nennenswerten Unterschiede im Laugenverbrauch.

5.2.5. Hemmung von Kallikrein durch DFP

Die Hemmung von Kallikrein durch DFP wurde ähnlich dem von uns beschriebenen Verfahren (Fiedler et al.1969) verfolgt. Alle Experimente wurden bei 25°C mit 0,2 bis 10 U/ml Kallikrein und 1,0 mM DFP in 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,20, durchgeführt, der 0,1 mM Thioglykolsäure enthielt, um eine mögliche Hemmung der Enzyme durch in den Präparaten enthaltene Schwermetallionen aufzuheben (Fiedler et al.1967).

Eine solche Hemmung der Reaktion von DFP mit Kallikreinen zeigte sich im Gegensatz zu früheren Angaben (Fiedler et al.1969) deutlich beim Pankreaskallikrein A, wahrscheinlich wegen eines höheren Verunreinigungsgrades. Das DFP wurde in 0,08 ml frischer wäßriger Lösung pro 1 ml Inkubationsansatz zugegeben. Der pH-Wert der Lösung wurde zu Beginn und am Ende eines jeden Hemmversuches mit einer Glaselektrode und einem pH-Meter (Pusl 12 S ADC) gemessen. Als Eichpuffer dienten Titrisole der Firma E.Merck der pH-Werte 7,0 und 9,0. Bei sämtlichen Versuchen änderte sich der pH-Wert im Versuchsverlauf um höchstens 0,05 pH-Einheiten. In den Experimenten mit den niedrigeren Kallikreinkonzentrationen wurden Proben bis zu einem Volumen von 0,15 ml ohne vorherige Verdünnung zur Bestimmung der restlichen Enzymaktivität nach

dem unter 5.2.2 beschriebenen Verfahren eingesetzt. Der zeitliche Verlauf der Hemmung wurde an Hand von 8 bis 12 Meßpunkten über etwa 2 bis 3 Stunden hinweg verfolgt, bis die Enzymaktivität auf etwa 40% oder weniger des Ausgangswertes gefallen war. Die Auswertung erfolgte nach 5.2.6.

5.2.6. Auswertung der kinetischen Experimente

Alle für die verschiedenen kinetischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit abgeleiteten Geschwindigkeitskonstanten sind 1.Ordnung und lineare Funktionen der Logarithmen einer Meßgröße in Bezug auf die Zeit oder eine Funktion der Zeit.

Die Auswertung aller dieser Messungen ließ sich deshalb auch auf eine im Prinzip gleiche Weise durchführen. Zunächst wurde durch Auftragen auf halblogarithmisches Koordinatenpapier die Linearität und die Streuung der Meßpunkte kontrolliert. Durch Ausgleichsrechnung nach der Methode der kleinsten Quadrate nach dem von Wilkinson (1961) beschriebenen Verfahren wurden die bestmöglichen Werte für Achsenabschnitt und Steigung der Geraden und die Standardfehler dieser Größen erhalten, wobei auf korrekte Wichtung der Meßgrößen geachtet wurde. Die Berechnungen wurden an einem Tischrechner Olivetti Programma 101 durchgeführt.

5.2.7. Darstellung von DFP-32-Kallikrein und DFP-32-Trypsin (Fiedler et al.1969)

13 mg Kallikrein A bzw. 11,8 mg Trypsin wurden mit 1,5 μ Mol DFP, das 10 μ C DFP-32 enthielt, in 3 ml 0,1 M Phosphatpuf-

fer (mit 0,05 ml Propylenglykol) pH 7,2 18 Stunden bzw. 2 Stunden bei 25°C inkubiert. Dann wurden die Lösungen gegen 5 Liter destilliertes Wasser unter mehrmaligem Wasserwechsel dialysiert. Hierauf wurde an einem Büchi-Rotavapor bis zur Trockne eingedampft.

Auf die gleiche Weise wurde aus 1 mg neuraminidasebehandeltem Kallikrein B das entsprechende DFP-Enzym hergestellt.

5.2.8. Partielle Säurehydrolyse von DFP-32-Kallikrein und DFP-32-Trypsin

Ca. 2 mg DFP-32-Kallikrein bzw. DFP-32-Trypsin wurden mit 2 ml halbkonzentrierter Salzsäure versetzt und ähnlich dem Verfahren von Naughton et al. (1960) 30 Minuten am siedenden Wasserbad erhitzt. Anschließend wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde 2 mal mit je 2 ml destilliertem Wasser aufgenommen und wieder eingedampft.

5.2.9. Abtrennung der stark sauren Peptide (Naughton et al. 1960)

Jeweils 0,7 mg der wie unter 5.2.8 hydrolysierten DFP-32-Enzyme wurden in 0,8 ml H₂O gelöst und auf eine mit 2g (Trockengewicht) Dowex 50 Wx8 (200 bis 400 mesh; H⁺-Form) beschickte und mit H₂O äquilibrierte Säule von 9 mm Durchmesser aufgesetzt. Es wurde mit Wasser eluiert. Die ersten 10 ml des Eluats enthielten über 90% der Radioaktivität und wurden am Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht.

5.2.10. Hochspannungselektrophorese

Die Hochspannungselektrophorese der Hydrolysate von DFP-32-Enzymen wurde mit der wassergekühlten Camag-Hochspannungselektrophoresezelle 61000 mit Schutzkasten und dem Camag-Hochspannungsgenerator HE-500 63000/63100 auf Whatman-Papier Nr.1, Format 40 x 20 cm, durchgeführt. Zur Auftrennung der radioaktiven Peptide wurde ein Pyridin-Essigsäure-Puffer pH 3,5 (Pyridin-Eisessig-H₂O = 1:10:189 Volumenteile; Naughton et al.1960) verwendet. Mittels einer Mikroliterpipette wurden pro 1 cm etwa 10 bis 20 Mikroliter wäßriges Hydrolysat mit 0,1 bis 0,2 mg Protein (ca. 0,1 µC/mg Protein) bzw. der entsprechenden Menge von mit Dowex 50 behandeltem Material in einer Entfernung von 10 cm vom Papierrand auf das trockene Papier aufgesetzt. Hydrolysate, die miteinander verglichen werden sollten (z.B. DFP-32-Trypsin und DFP-32-Kallikrein) wurden in einer Breite von 4 cm so aufgesetzt, daß sich die Aufsetzstellen in einer Breite von ca. 1 cm überlappten, um eine etwaige Identität der verschiedenen Zonen mit größtmöglicher Sicherheit zeigen zu können. Nach dem Aufsetzen der Proben wurde der Streifen von beiden Enden her so mit Puffer befeuchtet, daß sich die Pufferfront von beiden Seiten her gleich schnell der Auftragungsstelle näherte, wodurch die Bande der aufgetragenen Proben noch verschmälert wurde. Der Streifen wurde dann vorsichtig zwischen Filterpapier abgepreßt und in die Kammer eingelegt.

Für die Reelektrophorese der einzelnen Banden wurde ein

Pyridin-Essigsäure-Puffer vom pH 6,5 (Pyridin:Eisessig:H₂O = 10:0,4:90 Volumenteile; Naughton et al.1960) verwendet. In beiden Fällen wurde bei einer Spannung von 1600 V und einer Stromstärke von 10 bis 40 mA, die vom Befeuchtungsgrad des Papiers abhing, gearbeitet. Die Laufzeiten betrugen bei pH 3,5 etwa 120 Minuten, bei pH 6,5 etwa 70 Minuten, wobei die am schnellsten wandernde radioaktive Bande jeweils eine Laufstrecke von etwa 25 cm erreichte. In einem Vorversuch wurde gezeigt, daß gleichzeitig aufgetragenes anorganisches Phosphat in der am schnellsten wandernden Zone erscheint, was mit den Angaben von Naughton et al. (1960) übereinstimmt.

5.2.11. Autoradiographie

Die an der Luft getrockneten Elektropherogramme wurden mit radioaktiver Tinte (ca.10 µC P-32 (als DFP) und 5 mg Dextranblau (Molekulargewicht ca. 60 000) gelöst in 4 ml 0,3 N NaOH) markiert. Die Streifen wurden auf Kodak Kodirex- (Auto process)Röntgenfilm aufgelegt. Je nach der aufgesetzten Aktivität (0,2 bis 10 nC) wurde der Film nach 14 Tagen bis 10 Stunden entwickelt.

5.2.12. Elution der einzelnen Zonen

Die auf dem entwickelten Film sichtbaren Banden wurden über einer beleuchteten Glasplatte auf den Elektrophoresestreifen durchgepaust. Nach dem Ausschneiden der einzelnen Zonen ergaben sich Papierstreifen vom Format ca. 0,5 x 10 cm. Diese

wurden am nicht radioaktiven Ende spitz zugeschnitten und mit dem anderen Ende zwischen zwei Objektträger geklemmt. Diese wurden in ein mit Wasser gefülltes Becherglas getaucht. Die an der Spitze des Streifens sich sammelnde Flüssigkeit wurde in einem Reagenzglas bis zu einem Volumen von jeweils 0,1 bis 0,2 ml aufgefangen.

5.2.13. Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von Peptiden oder Proteinen

Die Proben, die jeweils ca. 3 bis 50 nMol der zu bestimmenden Aminosäuren enthielten, wurden mit jeweils 0,8 ml halbkonzentrierter HCl versetzt und im zugeschmolzenen Reagenzglas 18 Stunden bei 110°C hydrolysiert. Die Aminosäurezusammensetzung der Hydrolysate wurde nach sorgfältigem Entfernen der Salzsäure am Rotationsverdampfer am Beckmann-Analysator mit Beckmann-Integrator nach dem von Spackmann et al.(1958) angegebenen Verfahren bestimmt.

5.2.14. Bestimmung der Extinktionskoeffizienten und der Spontanhydrolyse von Cinnamoyl- und Indolacryloylimidazol

Cinnamoylimidazol wurde jeweils frisch vor Gebrauch aus Cyclohexan umkristallisiert. Schmelzpunkt: 132 bis 133°C (Schonbaum et al.(1961): 133 bis 133,5°C). Indolacryloylimidazol wurde aufgrund seiner größeren Stabilität direkt ohne Umkristallisieren verwendet.

Die Messungen wurden am Cary 15-Spektralphotometer unter

Verwendung des 0 - 0,1 Schleifdrahtes in thermostatisierten Küvettenhaltern bei 25°C durchgeführt. Kleine Volumina bis 50 µl wurden mit Mikroliterpipetten zugesetzt und durch leichtes Durchblasen von Luft vermisch. Der Wellenlängenvortrieb betrug 10 nm pro 20 Sekunden.

Zur Bestimmung der Extinktionskoeffizienten wurden in die Vergleichsküvette jeweils 1,98 ml Acetatpuffer pH 5,2 (0,1 M; 1 mM EDTA) und 20 µl Acetonitril gegeben. In der Meßküvette befanden sich 1,98 ml dieses Puffers und 20 µl einer ca. 0,3 mM Stammlösung der Substrate in Acetonitril. Die Cinnamoylspektren wurden von 350 bis 250 nm, die Indolacryloylspektren von 450 bis 325 nm aufgenommen.

Zur Kontrolle der Reinheit des Cinnamoylimidazols wurde ein Gemisch aus 1,98 ml H₂O und 20 µl Cinnamoylimidazol-Stammlösung mit 0,1 ml 2 N NaOH versetzt. Nach 3 Minuten wurde das Cinnamatspektrum aufgenommen.

Zur Messung der Spontanhydrolyse von Cinnamoylimidazol, die bei pH 5,2 im Gegensatz zum Verhalten von Indolacryloylimidazol bereits merklich ist, wurden in die Vergleichs- und Meßküvette jeweils 1,98 ml Acetatpuffer pH 5,2 gebracht. Die Vergleichsküvette wurde dann mit 20 µl Acetonitril und die Meßküvette mit 20 µl einer 0,3 mM Cinnamoylimidazolllösung in Acetonitril versetzt. Die Extinktionsabnahme bei 307 nm (Schonbaum et al. 1961) wurde bei einem Papiervorschub von 1 Zoll/min verfolgt.

Aus den experimentell erhaltenen Kurven wurden in Abständen von 5 Minuten die A_t -Werte entnommen. Die entsprechenden A_∞ -Werte wurden aus dem Zimtsäurespektrum bei pH 5,2 berechnet. Die Auswertung erfolgte nach Gleichung $\ln[CI]_0 = \ln[CI] - k_{\text{hydr}} \cdot t$; und 5.2.6.

5.2.15. Differenzspektren

Es wurden Enzymlösungen der gewünschten Konzentrationen (ca. 20 μM) in Acetatpuffer pH 5,2 hergestellt und mit einer Spritze durch ein Sartorius Membranfilter SM 11309, 0,1 μ Porengröße gedrückt. Zur Bestimmung der Enzymkonzentration wurde zunächst die Extinktion dieser Lösung bei 280 nm gegen Puffer gemessen und mit dem neuen, auf der Grundlage von Aminosäureanalysen bestimmten Wert von $A_{280}^{1\%} = 19,3$ in Konzentrationen umgerechnet. Die für diese Versuche verwendeten Präparate von neuraminidasebehandeltem Kallikrein A und B hatten eine spezifische Aktivität von 221 bzw. 213 U_{AT}/mg . Inzwischen wurden Kallikreinpräparate mit einer spezifischen Aktivität von bis zu 287 U_{AT}/mg erhalten. Die Konzentrationen von enzymatisch aktivem Kallikrein in den Reaktionsansätzen wurden mit Hilfe dieser beiden Werte für die spezifische Aktivität berechnet.

Die Messungen wurden am Cary 15-Spektralphotometer unter Verwendung des 0 - 0,1 Schleifdrahtes mit thermostatisierten Küvettenhaltern bei 25°C durchgeführt. Je 1,88 ml Enzymlösung wurden in die Vergleichs- und Meßküvette gebracht. Die Grundlinie des Instrumentes wurde im gewünschten Wel-

lenlängenbereich auf Null abgeglichen. Dann wurde die Vergleichsküvette mit 20 µl Acetonitril und die Meßküvette mit 20 µl einer 0,25 bis 0,40 mM Acylimidazol-Lösung in Acetonitril versetzt. Die Gesamtkonzentration an Acetonitril betrug 1,05%. Die Konzentration der Acylimidazole wurde in mehrfach wiederholten analogen Vorversuchen (mit 1,88 ml Puffer statt Enzymlösung) bestimmt. Hierbei wurden die Extinktionen im jeweiligen Absorptionsmaximum gemessen und daraus die Konzentrationen mit dem auf S.31 angegebenen, aus eigenen Messungen ermittelten Extinktionskoeffizienten berechnet. Bei den ersten Untersuchungen wurde jeweils im Abstand von 5 Minuten im Wellenlängenbereich von 350 bis 250 nm für Cinnamoylimidazol und von 450 bis 325 nm für Indolacryloylimidazol ein Differenzspektrum aufgenommen. Der Wellenlängenvortrieb betrug dabei etwa 50 nm pro Minute.

5.2.16. Bestimmung der Acylierungs- und Deacylierungsgeschwindigkeiten von Kallikrein mit Cinnamoyl- bzw. Indolacryloylimidazol

Die Messungen erfolgten auf die in 5.2.15 beschriebene Weise, wobei die Küvetten wie dort angegeben beschickt wurden. Zur Bestimmung der Acylierungsgeschwindigkeit von Kallikrein durch Cinnamoylimidazol wurde die Extinktionszunahme bei 335 nm bzw. durch Indolacryloylimidazol bei 410 nm bei einem Papiervorschub von 2,5 Zoll/min ca. 60 Minuten lang verfolgt.

Anschließend wurde zur Bestimmung der Deacylierungskonstanten jede Küvette mit jeweils 0,2 ml filtriertem (Sartorius

Membranfilter SM 11309, 0,1 μ Porengröße) 2 M Tris-HCl-Puffer versetzt. Dadurch wurde der pH-Wert in den Küvetten auf 8,8 umgestellt. Die Extinktionsabnahme wurde 30 Minuten aufgezeichnet, und zwar bei 300 nm für Cinnamoylkallikrein und bei 355 nm für Indolacryloylkallikrein. Die Deacylierung von Cinnamoylkallikrein wurde auch bei 250 nm verfolgt, wo durch das Auftreten von Zimtsäure ein Extinktionsanstieg zu beobachten ist.

Aus den experimentell bestimmten Kurven wurden in regelmäßigen Abständen von 30 Sekunden die A_t -Werte entnommen. Die entsprechenden A_{∞} -Werte wurden den Kurven an den Stellen entnommen, wo die Reaktion schon so weit beendet war, daß sich innerhalb von 5 Minuten keine merklichen Extinktionsänderungen mehr ergaben. Die Auswertung erfolgte nach Gleichung (10) bzw. (12) und 5.2.6.

5.2.17. Bestimmung der Inaktivierungsgeschwindigkeit von Kallikrein durch Cinnamoylimidazol

In 1,98 ml Acetatpuffer pH 5,2 (0,1 M; 1 mM EDTA) war neuraminidasebehandeltes Kallikrein A (Endkonzentration 0,2 μ M) gelöst. Dazu wurden 20 μ l 0,6 mM Cinnamoylimidazol-Lösung in Acetonitril gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei 25°C inkubiert. Im Abstand von 3 Minuten wurden dem Ansatz Proben von 50 bis 200 μ l (mit ca. 0,1 bis 0,4 U Kallikrein) entnommen und unverdünnt nach 5.2.1 ausgetestet. Die Auswertung erfolgte nach Gleichung (19) und 5.2.6.

5.2.18. Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von p-Nitrophenol

p-Nitrophenol wurde entweder 2 mal aus Toluol oder 2 mal aus Toluol und 1 mal aus Wasser umkristallisiert und gründlich getrocknet. Der Schmelzpunkt lag für das erste Material bei 112 bis 113°C, für das zweite bei 112,5 bis 113,5°C, während Kézdy et al (1962) 114,5 bis 115°C und das Handbook (1962) 114°C angeben.

Aus diesen Produkten wurden 2 μ M Lösungen in Veronalpuffer pH 8,3 (0,1 M; 1 mM EDTA; filtriert durch Sartorius Membranfilter SM 11309, 0,1 μ Porengröße) hergestellt. Die Extinktionen dieser Lösungen wurden am Cary 15 (0 - 0,1 Schleifdraht, thermostatisierte Küvettenhalter, 25°C) bei 402 nm bestimmt. Der Einfluß von 0,8% Acetonitril und 2 μ M Kallikrein auf die Extinktion dieser Lösungen wurde dabei überprüft.

5.2.19. Bestimmung der Acylierungsgeschwindigkeit von Kallikrein durch NPGB mit der "stopped flow"-Apparatur

Es stand ein Gibson-Durum "stopped flow"-Spektralphotometer mit 2 cm-Küvette und Thermostatisierungsvorrichtung (25°C) zur Verfügung.

Eine Vorratsspritze enthielt eine 1,1 μ M Kallikreinlösung (245 U_{AT}/mg ; Festlegung der Konzentration aufgrund von Aminosäureanalyse von 24-Stunden-Hydrolysaten nach 5.2.13) in Veronalpuffer pH 8,3 (0,1 M; 1 mM EDTA; filtriert durch

Sartorius Membranfilter SM 11309, 0,1 μ Porengröße), die andere eine 0,1 M (die Konzentration wurde aus der Einwaage ermittelt) NPG-B-Lösung in Wasser. Bei diesem pH-Wert konnte wegen der bereits merklichen Spontanhydrolyse das Substrat nicht in Puffer gelöst werden. Der pH-Wert des Puffers wanderte jedoch durch 1:1-Verdünnung mit Wasser um höchstens 0,02 pH-Einheiten aus.

Bei jeder Bestimmung wurden 0,3 ml aus jeder Eintreibrutsche in die Mischvorrichtung gedrückt. Die zeitliche Änderung der optischen Dichte wurde auf einem Speicheroszillographen registriert. Die x-Achse war auf 0,1 Sekunden pro Teilstrich und die y-Achse auf eine Transmissionsänderung von 1,25% pro Teilstrich eingestellt.

Es wurde ausschließlich in einem Transmissionsbereich von 100 bis 90% gearbeitet, was einer Extinktionsänderung von 0 bis etwa 0,05 entspricht. In diesem Bereich herrscht zwischen Transmission und Extinktion in ausreichender Genauigkeit Proportionalität.

Aus den experimentell bestimmten Kurven wurden die ΔA -Werte in Abständen von 0,05 Sekunden entnommen und nach Gleichung (26) und 5.2.6 ausgewertet.

5.2.20. Titration von Kallikrein mit NPG-B

Die Messungen wurden am Cary 15-Spektralphotometer (0 - 0,1 Schleifdraht in auf 25°C thermostatisierten Küvettenhaltern

durchgeführt. In der Vergleichsküvette befanden sich 1,98 ml Phosphatpuffer pH 6,5 bzw. Veronalpuffer pH 8,3 (jeweils 0,1 M; 1 mM EDTA; durch Sartorius Membranfilter SM 11309, 0,1 μ Porengröße, filtriert) und 20 μ l Acetonitril/ H_2O (4:1), in der Meßküvette 1,93 ml Puffer. Dann wurden 20 μ l 10 bis 4 mM NPGB-Lösung in Acetonitril/Wasser (4:1) mittels einer Mikroliterpipette in die Meßküvette gebracht und durch leichtes Durchblasen vermischt. Die durch den Substratzusatz bewirkte Extinktionsänderung bei 402 nm wurde aufgezeichnet. Anschließend wurden 50 μ l einer ca. 4 μ M (pH 6,5) bzw. ca. 2 μ M (pH 8,3) Kallikreinlösung (mit Sartorius Membranfilter filtriert) ebenfalls mit einer Mikroliterpipette in die Meßküvette gebracht und möglichst rasch vermischt. Etwa nach 5 Sekunden konnte mit der Aufzeichnung des Extinktionsverlaufs bei 402 nm bei einem Papiervorschub von 2,5 bzw. 5 Zoll/Minute begonnen werden. Die Reaktion wurde bis zu einer Endextinktion von 0,1 verfolgt.

Zur Ermittlung des burst π wurde die stationäre Reaktionsphase bis zum Zeitpunkt 0 zurückverlängert und der durch den Enzymzusatz bewirkte Extinktionssprung (maximal 0,0005 Extinktionseinheiten) und eine eventuelle Eigenextinktion der Kallikreinlösung (maximal 0,001 Extinktionseinheiten) berücksichtigt. Die Eigenextinktion des Kallikreins wurde bei den mit Substrat gestarteten Titrationsexperimenten bestimmt. Zur Ermittlung des burst mußte in diesen Fällen nur die Eigenextinktion der Substratlösung berücksichtigt werden, die ja aus den Titrationsversuchen mit Enzymstart bekannt war.

6. Zusammenfassung

Innerhalb der Fehlergrenzen der Bestimmungsmethode zeigten die Kallikreine aus Pankreas, Submandibularis und Harn des Schweins die gleiche Geschwindigkeit der Inaktivierung durch Diisopropylfluorophosphat. Die aktiven Zentren dieser Enzyme dürften demnach einen sehr ähnlichen, wenn nicht identischen Bau aufweisen. Für Pankreaskallikrein konnte die Sequenz Asp-Ser-Gly um das Serinmolekül im aktiven Zentrum wahrscheinlich gemacht werden.

Bei der Umsetzung von Pankreaskallikrein mit Cinnamoyl- oder Indolacryloylimidazol werden die entsprechenden Acylenzyme gebildet. Die mit der Bildung von Cinnamoylkallikrein parallel gehende Inaktivierung des Enzyms spricht dafür, daß die Umsetzung im aktiven Zentrum stattfindet. Das Differenzspektrum des Cinnamoylkallikreins zeigt die gleiche Feinstruktur wie die Spektren von Cinnamoyltrypsin und Cinnamoylchymotrypsin. Die Absorptionsmaxima von Cinnamoyl- und Indolacryloylkallikrein liegen denen der entsprechenden Acyltrysine relativ nahe, was für Ähnlichkeiten im Bau der aktiven Zentren der beiden Enzyme spricht. Darauf weist auch die Ähnlichkeit der Acylierungsgeschwindigkeit beider Enzyme durch Cinnamoylimidazol hin.

Bei der Umsetzung von Pankreaskallikrein mit p-Nitrophenyl-p'-guanidinobenzoat wurde ein biphasischer Verlauf der Freisetzung von Nitrophenol beobachtet. Dies ist eine starke

Stütze für das Vorliegen eines Acylenzym-Mechanismus bei durch Kallikrein katalysierten hydrolytischen Reaktionen. Das Substrat erwies sich als geeignet für die Titration der aktiven Zentren des Enzyms. Pro Kallikreinmolekül wurden dabei $1,36 \pm 0,04$ aktive Zentren ermittelt. Dieser Befund legt eine Überprüfung des bisher für Kallikrein angenommenen Molekulargewichts dringend nahe.

Beide elektrophoretisch unterscheidbaren Formen des Kallikreins des Schweinepankreas, A und B, verhielten sich bei allen Versuchen völlig gleich. Alle Befunde sprechen dafür, daß die beiden Kallikreine in die Gruppe der untereinander nahe verwandten Serinproteinasen des Pankreas einzureihen sind, deren bisher bestuntersuchte Vertreter die Enzyme Chymotrypsin, Trypsin und Elastase darstellen.

7. Literaturverzeichnis

- Andrews, P. (1970), Methods of Biochemical Analysis 18, 1
- Baines, N. J., Baird, J. B., und Elmore, D. T. (1964),
Biochem. J. 90, 470
- Balls, A., und Jansen, E. F. (1952), Advances in Enzymology
13, 321
- Barman, T. E., und Gutfreund, H. (1966), Biochem. J. 101, 411
- Bender, M. L., Schonbaum, G. R., und Zerner, B. (1962),
J. Am. Chem. Soc. 84, 2540
- Bender, M. L., und Kaiser, E. T. (1962a), J. Am. Chem. Soc.
84, 2556
- Bender, M. L., Killheffer, J. V., Jr., und Kézdy, F. J.,
(1964), J. Am. Chem. Soc. 86, 5330
- Bender, M. L., Begué-Canton, M. L., Blakeley, R. L., Bruba-
cher, L. J., Feder, J., Gunter, C. R., Kézdy, F. J.,
Killheffer, J. V., Jr., Marshall, T. H., Miller, C.
G., Roeske, R. W., und Stoops, J. K. (1966), J. Am.
Chem. Soc. 88, 5890
- Bender, M. L., Kézdy, F. J., und Wedler, F. C. (1967),
J. Chem. Education 44, 84
- Bernhard, S. A., Lau, S. J., und Noller, H. (1965), Biochem.
4, 1108
- Bernhard, S. A., und Tashijan, Z. H. (1965), J. Am. Chem.
Soc. 87, 1806
- Caplow, M. (1969), J. Am. Chem. Soc. 91, 3639
- Charles, M., Roverly, M., Guidoni, A., und Desnuelle, P.
(1963), Biochem. Biophys. Acta 69, 115

- Chase, T., Jr., und Shaw, E. (1967), Biochem. Biophys. Res. Commun. 29, 508
- Chase, T., Jr., und Shaw, E. (1969), Biochem. 8, 2212
- Cunningham, L. W., Jr. (1954), J. Biol. Chem. 211, 13
- Curagh, E. F., und Elmore, D. T. (1964), Biochem. J. 92, 163
- Dixon, G. H. (1966), Essays in Biochemistry (Biochemical Society, London) 2, 147
- Eck, R. V., und Dayhoff, M. O. (1966), Atlas of Protein Sequence and Structure, S. 64, Nat. Biomed. Res. Found., Silver Spring, Maryland
- Elliot, D. F., Lewis, G. P., und Horton, E. W. (1960), Biochem. Biophys. Res. Commun. 3, 87
- Elliot, D. F., und Lewis, G. P. (1965), Biochem. J. 95, 437
- Fahrney, D. E., und Gold, A. M. (1963), J. Am. Chem. Soc. 85, 997
- Fiedler, F., und Werle, E. (1967), Z. physiol. Chem. 348, 1087
- Fiedler, F. (1968), Z. physiol. Chem. 349, 926
- Fiedler, F., und Werle, E. (1968), Europ. J. Biochem. 7, 27
- Fiedler, F., Müller, B., und Werle, E. (1969), 10, 419
- Fiedler, F., Hirschauer, G., und Werle, E. (1970), Z. physiol. Chem. 351, 225
- Fiedler, F., Müller, B., und Werle, E. (1970a), Z. physiol. Chem. 351, 1002
- Fink, G., und Patat, F. (1969), Z. physiol. Chem. 350, 1501

- Frey, E. K., Kraut, H., Werle, E., Vogel, R., Zickgraf, G.,
und Trautschold, I. (1968), Das Kallikrein-Kinin-
System und seine Inhibitoren, Ferdinand Enke Verlag,
Stuttgart
- Fritz, H., Trautschold, I., und Werle, E. (1965), Z.physiol.
Chem. 342, 253
- Fritz, H., Eckert, I., und Werle, E. (1967), Z. physiol.
Chem. 348, 1120
- Fritz, H., Brey, B., Schmal, A., und Werle, E. (1969), Z.
physiol. Chem. 350, 617
- Gutfreund, H., und Sturtevant, J. M. (1956), Biochem. J.
63, 656
- Habermann, E. (1959), Arch. Exp. Path. Pharmakol. 236, 492
- Habermann, E. (1960), Naturwissensch. 47, 111
- Habermann, E. (1962), Z. physiol. Chem. 328, 15
- Habermann, E., und Blennemann, G. (1964), Arch. Exp. Path.
Pharmakol. 249, 357
- Habermann, E., und Klett, W. (1966), Biochem. Z. 346, 133
- Handbook (1962), Handbook of Chemistry and Physics, Heraus-
geber C. D. Hodgeman, The Chemical Rubber Publi-
shing Co., Cleveland, Ohio
- Hartley, B. S. (1970), Transact. Roy. Soc., London, 257, 77
- Henderson, R. (1970), J. Mol. Biol. 54, 341
- Hofmann, T. (1964), Biochem. 3, 356
- Johansen, J. T., Oliver, R. W. A., und Svendsen, I. (1969),
Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg 37, 87

- Kasserra, H. P., und Laidler, K. J. (1969), *Canad. J. Biochem.* 47, 4031
- Kézdy, F. J., und Bender, M. L. (1962), *Biochem.* 1, 1097
- Mercouroff, J., und Hess, G. P. (1963), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 11, 283
- Moon, A. Y., Mercouroff, J., und Hess, G. P. (1965), *J. Biol. Chem.* 245, 717
- Moriya, H. (1959), *J. Pharmacol. Soc. Japan* 79, 1451
- Moriya, H., Kato, A., und Fukushima, H. (1969), *Biochem. Pharmacol.* 18, 549
- Naughton, M. A., Sanger, F., Hartley, B. S., und Shaw, D.C. (1960), *Biochem. J.* 77, 149
- Neurath, H. (1964), *Federat. Proc.* 23, 1
- Neurath, H., Walsh, K. A., und Winter, W. P. (1967), *Science* 158, 1638
- Oliver, R. W. A., Viswanatha, T., und Wish, W. J. D. (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27, 107
- Oosterbaan, R. A., und Cohen, J. A. (1964), in "Structure and Activity of Enzymes", Herausgeber T. W. Goodwin, J.I. Harris und B. S. Hartley, Academic Press, London und New York
- Pierce, J. V., und Webster, M. E. (1961), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 5, 353
- Rocha e Silva, M., Beraldo, W. T., und Rosenfeld, G. (1949), *J. Physiol.(London)* 109, 488
- Sanger, F., und Shaw, D. C. (1960), *Nature* 187, 872

- Saunders, B. C., und Stacey, G. J. (1948), J. Chem. Soc.
(London) 695
- Schonbaum, G. R., Zerner, B., und Bender, M. L. (1961),
J. Biol. Chem. 236, 2930
- Schwert, G. W., und Eisenberg, M. (1949), J. Biol. Chem.
179, 665
- Sigler, P. B., Blow, D. M., Matthews, B. W., und Henderson, R.
(1968), J. Mol. Biol. 35, 143
- Smith, E., Markland, F. S., Kaspar, C. B., DeLange, R. J.,
Landon, M., und Evans, W. H. (1966), J. Biol.
Chem. 241, 5974
- Spackman, D. H., Stein, W. H., und Moore, S., (1958), Anal.
Chem. 30, 1190
- Trautschold, I., und Werle, E. (1961), Z. physiol. Chem.
325, 48
- Trautschold, I. (1965), Habilitationsschrift Med. Fak.,
Universität München
- Travis, J., und Liener, I. E. (1965), J. Biol. Chem. 240, 1962
- Vogel, R., Trautschold, I., und Werle, E. (1966), Natürliche
Proteinaseinhibitoren, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Wang, J. H., und Parker, L. (1967), Proc. Nat. Acad. Sci.
58, 2451
- Webster, M. E., und Pierce, J. V. (1963), Ann. N. Y. Acad.
Sci. 104, 91
- Werle, E. (1936), Klin. Wschr. 15, 348
- Werle, E. (1936a), Biochem. Z. 287, 235

Werle, E., und Däumer, J. (1940), Biochem. Z. 304, 377

Werle, E, und Kaufmann-Boetsch, B. (1960), Z. physiol.
Chem. 319, 52

Werle, E., Trautschold, I., und Leysath, G. (1961),
Z. physiol. Chem. 326, 174

Werle, E., und Trautschold, I. (1963), Ann. N. Y. Acad. Sci.
104, 117

Werle, E., und Fiedler, F. (1969), Biochem. J. 115, 4 P

Whitacker, D. R., und Roy, C. (1967), Canad. J. Biochem. 45,
911

Wilkinson, G. N..(1961), Biochem. J. 80, 324

Lebenslauf

Geboren: 23. 6. 1941 in München

Vater: Josef Müller, Vermessungsrat

Mutter: Emilie, geb. Werner

1947 - 1951 Volksschule an der Gebelestraße,
München

1951 - 1960 Wilhelms-Gymnasium, München
Reifeprüfung: Juli 1960

seit November 1960: Chemiestudium an der Universität München

Mai 1963: Diplom-Vorprüfung

November 1967: Diplom-Hauptprüfung

Dezember 1967 -
Februar 1969: Diplomarbeit unter Leitung von Prof.
Dr. Dr. E. Werle am Institut für Kli-
nische Chemie und Klinische Biochemie
der Universität München. Thema: "Hem-
mung von Kallikrein aus Schweinepan-
kreas durch Diisopropylfluorophosphat:
Kinetik, Stöchiometrie und Natur der
phosphorylierten Gruppe"

ab März 1969 Arbeiten zur vorliegenden Dissertation

ab Juni 1969 wissenschaftlicher Angestellter beim
Sonderforschungsbereich 51, München

